

UNTERSUCHUNGEN ZUR KONTROLLE DES BIOPTERIN-
BESTANDES IM SÄUGER

Günter Hennings

1977

UNTERSUCHUNGEN ZUR KONTROLLE DES BIOPTERIN-
BESTANDES IM SÄUGER

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorgelegt von Günter Hennings
aus
Uelzen

1977



1. Referent: Prof. Dr. H. Rembold

2. Referent: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.7.1977

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Rembold durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen:

Herrn Dr. R.G.H. Cotton, Parkville, Australien, und Herrn Dr. D.A. Häberle, München, für ihre vertrauensvolle und fruchtbare Zusammenarbeit in klinischen und physiologischen Fragestellungen, Herrn Dr. P.E. Schulze, Berlin, für seine Unterstützung bei der Synthese der ^3H -markierten Pteridine und bei der Autoradiographie.

Frau S. Rohrschneider danke ich für ihre wertvolle technische Assistenz und Frau H. Mehl für die Reinschrift des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. H. Rembold, dessen stetes Interesse den Fortgang dieser Arbeit entscheidend beeinflusst hat, sei besonders herzlich gedankt.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0093

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG	4
2. EXPERIMENTELLER TEIL	11
2.1. <u>Synthese isotoopenmarkierter Pteridine</u>	11
2.1.1. Vorstufen	11
2.1.2. Synthese von ³ H-Diacetyl	11
2.1.3. Pteridinsynthesen	12
2.2. <u>Chromatographische Methoden</u>	15
2.3. <u>Spektroskopische Methoden</u>	16
2.3.1. UV-Spektren	16
2.3.2. NMR-Spektren	16
2.3.3. Massenspektren	16
2.4. <u>Radioaktivität</u>	16
2.5. <u>Enzymbestimmungen</u>	17
2.5.1. Lactatdehydrogenase	17
2.5.2. Saure Phosphatase	17
2.5.3. Inosindiphosphatase	18
2.5.4. Cytochrom-c-oxidase	18
2.6. <u>Protein</u>	19
2.7. <u>Bindungsstudien an Serumproteinen</u>	19
2.7.1. Aufbereitung der Blutproben	19
2.7.2. Inkubationsbedingungen	19
2.7.3. Nachweis der Pteridin-Protein-Wechselwirkung durch Filtration über Dextrangele	20
2.7.4. Gleichgewichtsdialyse	20
2.8. <u>Elektrophorese</u>	21
2.9. <u>Affinitätschromatographie</u>	21
2.10. <u>Versuchstiere</u>	22
2.11. <u>Regionale Studien</u>	22
2.12. <u>Gewebefraktionierung</u>	24
2.12.1. Differentialzentrifugation	24

	<u>Seite</u>
2.12.2. Synptosomendarstellung	25
2.12.3. Dichtegradientenzentrifugation	25
2.12.4. Auswaschversuche	25
2.12.5. Einbauversuche	26
2.13. <u>Crithidiatest</u>	26
2.14. <u>Ganztierautoradiographie</u>	28
2.15. <u>Sonstige Methoden</u>	29
2.16. <u>Berechnung, Auswertung und Darstellung der Ergebnisse</u>	29
2.16.1. Proteinkonzentration	30
2.16.2. Volumenaktivität	30
2.16.3. Biopterinverteilung	31
2.16.4. Gleichgewichtsdialyse	31
3. ERGEBNISSE	33
3.1. <u>Synthese ³H-markierter Pteridine hoher spezifischer Radioaktivität</u>	33
3.1.1. Modellsubstanzen und Synthesewege	33
3.1.2. Synthese von tritiiertem Diacetyl	35
3.1.3. Isotopeneffekt des Deuterium- und Tritiumeinbaus	37
3.1.4. Stabilität der Methylgruppen gegen HD- und HT-Austausch	37
3.1.5. Synthese ³ H-markierter Pteridine aus bromierten Vorstufen	38
3.2. <u>Charakterisierung der Brommethylpteridine</u>	39
3.3. <u>Kompartimentierung von Biopterin im Säuger</u>	42
3.3.1. Regionale Verteilung von Biopterin (Crithidiaaktivität) in der Ratte	42
3.3.2. Regionale Verteilung von 2^{14}C-BH_4 in der Ratte	44
3.4. <u>Kontrolle des Biopterinbestandes im Säuger</u>	46
3.4.1. Transport- und Verteilungsfunktion des Blutes	46
3.4.1.1. Bindungseigenschaften des Gesamtserums	46
3.4.1.2. Anreicherungsversuche Pteridin-bindender Proteine	48

3.4.1.3.	Eigenschaften der Pteridin-Protein-Wechselwirkung	51
3.4.1.4.	Funktion der Erythrocyten im Kofaktortransport	53
3.4.2.	Intrazelluläre Verteilung von Biopterin	55
3.4.2.1.	Subzelluläre Kompartimentierung	55
3.4.2.2.	Auswasch- und Bindungsversuche	58
3.4.2.3.	Bindung von Tetrahydrobiopterin an Mitochondrien	60
3.4.3.	Die Niere als Biopterin bilanzierendes Organ	63
3.4.3.1.	Mikropunktionsstudien	63
3.4.3.2.	Clearancestudien zur Ausscheidung crithidia-aktiver Substanzen	64
3.5.	<u>Biopterin und atypische Phenylketonurie</u>	64
4.	DISKUSSION	70
4.1.	<u>Isotopenmarkierte Pteridine</u>	70
4.2.	<u>Tetrahydrobiopterin und die Biosynthese der biogenen Amine</u>	74
4.3.	<u>Störungen des Biopterinstoffwechsels (LHPA)</u>	75
4.4.	<u>Bereitstellung, Bilanzierung und physiologische Funktion des Tetrahydrobiopterins</u>	78
4.4.1.	Biosynthese des Kofaktors	78
4.4.2.	Stoffwechselfunktion der Tetrahydropterine	78
4.4.3.	Kompartimentierung von Biopterin und Tetrahydrobiopterin	80
4.4.4.	Transport und Verteilung des Kofaktors	81
4.4.5.	Die Rolle der Niere in der Bilanzierung des Kofaktors	82
4.4.6.	Die Rolle exogenen Biopterins (Nahrungsaufnahme)	82
4.4.7.	Bilanzierung von Biopterin-eine zelluläre Leistung	83
5.	ZUSAMMENFASSUNG	85
6.	LITERATUR	87
7.	LEBENS LAUF	94
8.	ANHANG	95

1. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Stoffklasse der Pteridine hat zuerst Hopkins (1) beschrieben und sie als typische Schmetterlingspigmente angesehen. Ihre Strukturen wurden erst 1940 von H. Purrmann als Derivate des Pyrimido-(4,5b)-pyrazins (I) aufgeklärt (2).

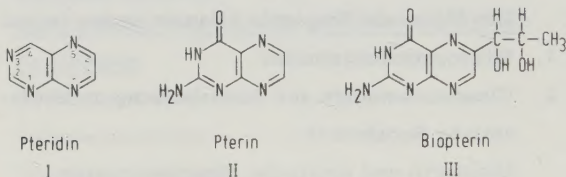


Abb. 1: Strukturformeln verschiedener Pteridine

Der Name Pterin, ursprünglich als Sammelname für alle Schmetterlingspigmente verwendet, diente schließlich als Kurzname für die Klasse der natürlich vorkommenden 2-Amino-4-hydroxypteridine (II). Im Jahre 1955 isolierten Patterson et al. (3) aus menschlichem Harn das Biopterin (2-Amino-4-hydroxy-6-(L-erythro -1', 2'-dihydroxypropyl)pteridin, III), ein unkonjugiertes Analogon der Folsäure.

Biopterin ist in der Natur in äußerst niedriger Konzentration und nahezu ubiquitär verbreitet. Es wurde aus *Drosophila melanogaster* (5, 6), *Ephestia kühniella* (7), Fischen (8), Ameisen (9), Bienenpuppen (10), Rattenharn (11) und dem Weiselzellenfuttersaft der Bienenkönigin (12) isoliert. Eine eingehende Übersicht wurde von Rembold und Gyure (4) gegeben.

S. Kaufman konnte in den Jahren 1958 - 1963 zeigen, daß das Enzym Phenylalaninhydroxylase (EC 1.14.3.1) als Wasserstoffdonator ein reduziertes Pterin benötigt. Er konnte 7,8-Dihydrobiopterin (6-(L-erythro)dihydroxypropyl-7,8-dihydropterin, BH₂, IV) aus Rattenleber isolieren und die Struktur des enzymatisch aktiven Kofaktors als 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin

(BH₄, V) aufklären (13, 14). In den folgenden Jahren wurde die Bedeutung reduzierter Pterine als Kofaktoren für die enzymatische Hydroxylierung von Tyrosin zu 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) (15), von Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan (16), von Progesteron in 17- α -Stellung (16), für die Oxidation von Glyceryläthern (17) und als Kofaktor der Indolamin-2,3-dioxygenase (19) nachgewiesen. Besonderes Gewicht kam der Entdeckung von M. Levitt et al. (20) zu, daß im Säuger die Hydroxylierung des Tyrosins zu DOPA der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Biosynthese der Katecholamine ist. Möglicherweise gilt dies auch für die Hydroxylierung des Tryptophans zu 5-Hydroxytryptophan, der Vorstufe des Serotonins (21).

Die ubiquitäre Verbreitung und das negative Redoxpotential der reduzierten Pterine veranlaßten Rembold und Metzger (22), nach weiteren Stoffwechselfunktionen dieser Substanzklasse zu suchen. So sind ihre polarographischen Halbstufenpotentiale denen der Pyridinnucleotide ähnlich, das Standardredoxpotential des Tetrahydroneopterin (5,6,7,8-Tetrahydro-6-(L-erythro-1',2',3'-trihydroxypropyl)pterin, VI) liegt im Bereich der Cytochrompotentiale (23). In vivo werden die Pterine in Organe mit hoher Stoffwechselaktivität eingebaut (24). Rembold und Buff (25, 26) zeigten dann sowohl mit intakten Mitochondrien als auch in einem löslichen Elektronentransfersystem die katalytische Rolle der Tetrahydropterine und machten damit eine ähnliche Funktion als Elektronenmediatoren im zellulären Elektronentransport wahrscheinlich. Die physiologische Bedeutung eines solchen Systems ist noch unbekannt, die Autoren diskutieren jedoch die Möglichkeit einer Regenerierung oxidierten Pyridinnucleotide in Zellen hoher anaboler Aktivität. Ihre Hypothese fand eine gewisse Bestätigung durch Kokolis (27), der in regenerierendem Lebergewebe und Tumorzellen stark erhöhte Tetrahydrobiopterinspiegel feststellen konnte. Bei der Suche nach weiteren Stoff-

wechselfunktionen fällt ihre pharmakologische Wirkung auf. So sind die strukturanalogen 2,4-Diaminopteridine (z. B. 2,4,7-Triamino-6-phenylpteridin, Triamteren) Diuretika vom Typ der sogenannten "Pseudoaldosteronantagonisten" (28). Ihr Wirkungsmechanismus ist allerdings noch unklar, worauf in der Diskussion dieser Arbeit eingegangen wird. Sie sind außerdem Hemmstoffe der Dihydrofolatreduktase (EC 1.5.1.3) und werden als Cytostatica in der Therapie maligner Tumoren eingesetzt (z. B. 4-Amino-4-deoxy-10-methylpteroylglutamat, "Methotrexat") (29). Eine größere Beachtung fanden die reduzierten Pterine auch mit wachsendem Einblick in die Regulation der Biosynthese biogener Amine (30-37).

Neben dem allgemeinen biochemischen Aspekt gewann diese Forschungsrichtung plötzlich eine zusätzliche Aktualität durch Befunde mehrerer Arbeitsgruppen (38-41), daß verschiedene Formen der Phenylketonurie (PKU) möglicherweise auf einer Störung der Kofaktorregenerierung bzw. seines Stoffwechsels beruhen. Nachdem Jervis (42) gezeigt hatte, daß der klassischen Phenylketonurie eine Defizienz der Phenylalaninhydroxylase zugrunde liegt, schien die Ursache dieser Erbkrankheit geklärt zu sein. Kaufman konnte aber in seinen Arbeiten zur enzymatischen Hydroxylierung aromatischer Aminosäuren schon früh die Beteiligung eines regenerierenden Enzyms, der Dihydropterinreduktase (DHPR) zeigen (14). Die DHPR ist ein notwendiger Bestandteil nicht nur der enzymatischen Phenylalanin-, sondern auch der Tyrosin- und Tryptophanhydroxylierung. In Abwesenheit des regenerierenden Enzymsystems lagert sich die chinoide Form des Dihydrobiopterins, die allein Substrat der DHPR ist, in das enzymatisch inaktive 7,8-Dihydrobiopterin (IV) um. Das folgende Schema zeigt den Mechanismus der enzymatischen Hydroxylierung aromatischer Aminosäuren am Beispiel des

Phenylalanins:

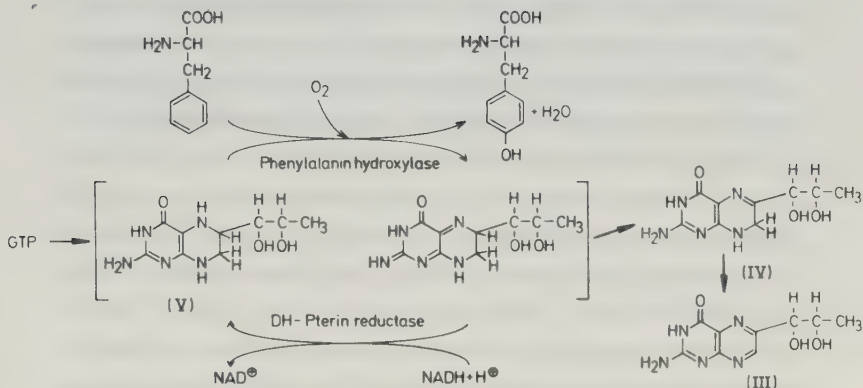


Abb. 2: Hydroxylierung aromatischer Aminosäuren durch mischfunktionelle Oxygenasen unter Beteiligung reduzierter Pteridinkofaktoren und der Dihydropterinreduktase (DHPR)

Störungen des regenerierenden Enzyms (DHPR) oder der Kofaktorbereitstellung können damit direkt die Biosynthese der Neurotransmitter Noradrenalin, Dopamin und Serotonin beeinträchtigen.

Anhand des in Abbildung 2 dargestellten Schemas seien einige mögliche Störungen dieses die mischfunktionelle Oxygenase aktivierenden bzw. den Pterinkofaktor regenerierenden Systems erwähnt, die zu klinischen Symptomen führen können:

1. Die Phenylalaninhydroxylase ist nicht vorhanden oder enzy-

matisch inaktiv. Phenylalanin oder seine Metabolite (Phenylbrenztraubensäure, Phenylmilchsäure, Phenylacetylglutamin) überschwemmen dann den Körper einschließlich des Zentralnervensystems. Die resultierenden klinischen Symptome (Debilität, Oligophrenie, Störungen des extrapyramidalen Systems, Ekzeme, Krampfstörungen, erhöhter Muskeltonus und gesteigerte Sehnenreflexe) sind bei kontrollierter phenylalanin-armer Diät reversibel (klassischer Krankheitsverlauf). Wie weit in einem solchen Fall auch die Kofaktorsynthese beeinflusst wird, ist nicht bekannt.

2. Der Kofaktor wird nicht in ausreichender Menge oder nicht in aktiver Form synthetisiert.
3. Die Konservierung des aktiven Kofaktors auf zellulärer Ebene ist gestört.

Jede dieser Störungen mit möglicherweise komplexeren Einzelursachen kann zur Symptomatologie der PKU führen, wobei aber starke Variationen in der Schwere der klinischen Effekte auftreten können. So schätzt Bartholomé (43) den Anteil "atypischer" Varianten auf 30 - 40 % aller klinisch manifesten PKU-Fälle. Einige Fälle mit besonders schweren Ausfallerscheinungen zeigen eine Defizienz im kofaktorregenerierenden System (DHPR) oder sind möglicherweise die Folge einer gestörten Kofaktor-Biosynthese (41, 44). Alle Fälle dieser (letalen) Hyperphenylalaninämie sind auch bei sorgfältig eingestellter phenylalanin-armer Diät in ihrer Symptomatik irreversibel. Bartholomé (45) konnte in einem leichteren Fall mit Erfolg eine Substitutionstherapie mit DOPA, der Vorstufe der Katecholamine, durchführen und damit die offensichtliche Neurotransmitterdefizienz ersetzen.

Bereits die kurze Zusammenstellung dieser verschiedenartigen Befunde legt die Vermutung nahe, daß reduzierte Pterine wichtige Stoffwechselreaktionen katalysieren und daß ihrer Bestands-

kontrolle lebenswichtige Bedeutung zukommt. Ausgangspunkt für die nachfolgend beschriebenen Experimente waren Befunde von Rembold et al. (46), wonach der Säugetierorganismus in der Lage ist, parenteral (i. p.) zugeführtes Tetrahydrobiopterin (BH_4) nahezu quantitativ zu retinieren, während Biopterin selbst zu 90 % renal ausgeschieden wird. Die Existenz der struktur-analogen Pteridindiuretika führte in diesem Zusammenhang zur Vermutung, daß ihre diuretische Aktivität aus ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum natürlichen Kofaktor (BH_4) resultieren könnten und die Niere durch spezifische Resorptionsprozesse an der Bilanzierung von Biopterin beteiligt sein könnte. Allerdings mußte hierbei auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß das Blut über eine starke und spezifische Proteinbindung als Transportvehikel und Oxidationsschutz dient. Nach Synthese hoch markierter 3H -Pteridine wurden deshalb zuerst Untersuchungen zur Spezifität der Pteridin-Proteinwechselwirkung an Humanblut und -serum durchgeführt.

Biopterin wird vom trypanosomiden Flagellaten *Crithidia fasciculata* als essentieller Wachstoffsstoff benötigt (69, 70). Das natürlich vorkommende 6-(L-erythro-1', 2'-dihydroxypropyl)-pterin hat, verglichen mit seinen drei optischen Isomeren, nach Green und Rembold (48) den höchsten wachstumsstimulierenden Effekt.

Tab. 1: Stimulierung des *Crithidia*wachstums durch die verschiedenen optischen Isomeren des Biopterins (Green und Rembold (48))

Biopterin	halboptim. Wachstoffsstoffkonzentration (ng/ml)
6-L-erythro	0,006
6-D-erythro	0,7
6-L-threo	0,2
6-D-threo	0,5

Die mikrobiologische Bestimmung der endogenen Konzentrationen des Biopterins lieferte die Grundlagen für Bindungsstudien an regionalen und subzellulären Kompartimenten. In Kombination mit physiologischen Untersuchungsmethoden an der Niere konnte damit ein Vorschlag für mögliche Mechanismen zur Kontrolle des Kofaktorbestandes entwickelt werden, der zu einem Therapieversuch in einem Fall mit "atypischer" PKU führte.

2. EXPERIMENTELLER TEIL

2.1. Synthese isotopenmarkierter Pteridine

Die Formelbilder sind zur besseren Übersicht in der Klapp-
tafel im Anhang zu finden.

2.1.1. Vorstufen

Dibromdiacetyl (1,4-Dibrombutan-2,3-dion, VII), Mono-
vinylacetylen (Buten-(1)-in-(3), VIII) und Diacetylen
(Butadiin-(1,3), IX) wurden nach publizierten Vorschriften her-
gestellt (49, 50).

2.1.2. Synthese von ^3H -Diacetyl

Diacetyl (Butan-2,3-dion, X) wurde aus den Vorstufen unter Be-
dingungen hergestellt, die sich für eine Radiosynthese ausnützen
lassen.

a) Katalytische Reduktion von Dibromdiacetyl (VII)

10 mg (0,04 mmol) VII in 1,0 ml Tetrahydrofuran (THF) wurden
zu 5 mg Katalysator (Pd/CaCO_3) in eine Mikroapparatur nach
Rembold und Metzger (22) gegeben und unter kräftigem Rühren
hydriert. Nach Aufnahme der berechneten Menge Wasserstoff
wurde die Reaktion abgebrochen, der Katalysator über eine Glas-
fritte abfiltriert und das entstandene Diacetyl (X) direkt in eine
Vorlage mit einer Suspension des entsprechenden Pyrimidinderi-
vates (XIII, XIV) destilliert und zum Pteridin zyklisiert.

Ausbeute: 0-3 % d. Th., bezogen auf VII.

b) Mikrohydratisierung von Diacetylen (IX)

In einem Reaktionskolben (25 ml) wurden 150 mg (9,5 mmol) HgO

eingewogen. Nach Zugabe von 100 µl (5 mmol) Wasser und 20 µl (0,3 mmol) H_2SO_4 wurde der Kolben dicht mit einem Schiffsatz mit Kühlfinger verbunden. Die Mischung wurde gut mit Aceton-Trockeneis gekühlt. Durch einen Hahn wurden dann 100 µl (1,4 mmol) Diacetylen (IX) eingespritzt. Der Hahn wurde sofort wieder gut verschlossen. Nach Beschickung des Kühlfingers mit einer Eis-Wassermischung wurde der Reaktionskolben 30 Minuten auf dem Wasserbad erhitzt, bis sich die Quecksilberadditionsverbindung von X gebildet hat. Diacetyl wurde durch Zugabe von 50 µl konzentrierter HCl freigesetzt und in eine Vorlage destilliert, die 0,4 mmol des entsprechenden Pyrimidins (XIII, XIV) enthielt. Die Mischung wurde 1 Stunde auf dem Wasserbad erhitzt, wobei das gebildete Pteridin als hellgelber Niederschlag ausfiel. Überschüssiges Wasser und nicht umgesetztes Diacetyl wurden nach Beendigung der Kondensationsreaktion in eine Vorlage destilliert und mit einem Überschuß Pyrimidin restlos umgesetzt. Restliches Wasser, Salzsäure und H_2SO_4 wurden in der nächsten Falle mit festem KOH gebunden.

2.1.3. Pteridinsynthesen

6,7-Dimethylpterin (2-Amino-4-hydroxy-6,7-dimethylpteridin, XI) und 2,4-Diamino-6,7-dimethylpteridin (XII) wurden durch Kondensation von 2,5,6-Triamino-4-hydroxypyrimidin (TOP, XIII) bzw. 2,4,5,6-Tetraaminopyrimidin (TRAP, XIV) mit Diacetyl (X) synthetisiert (51).

6,7-Bis(brommethyl)pterin (XV) und 2,4-Diamino-6,7-bis(brommethyl)pteridin (XVI) wurden nach einer modifizierten Vorschrift von Boothe et al. (52) hergestellt. 4,5 mmol des entsprechenden Pyrimidins (XIII, XIV) wurden in je 15 ml 1,5 N HBr gelöst und zu 1,11 g (5,6 mmol) VII in 10 ml Äthanol (96 %) gegeben und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung

wurde auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt und mehrere Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Das ausgefallene Produkt wurde abgesaugt und gründlich mit Äther, Äthanol und Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 2,3 mmol (46 % d. Th.)

6-Methyl-7-brommethylpterin (XVII) wurde aus XI durch direkte Bromierung mit Br_2 in 2,5 N HBr hergestellt (52) und in der oben beschriebenen Weise gereinigt. Die direkte Bromierung von XII führt wegen der Hydrolyse der 4-Aminogruppe ebenfalls zum bromierten Pterin XVII.

CHN-Analyse

Bis(brommethyl)pterin (XV)

gefunden C 27,50 H 2,02 N 20,20 Br 45,80 %

berechnet 27,26 2,11 19,98 45,76

2,4-Diamino-6,7-bis(brommethyl)pteridin (XVI)

gefunden C 21,98 H 2,46 N 19,20 Br 50,30 %

berechnet 22,20 2,20 19,50 55,70

2,4-Diamino-6,7-ditritiomethylpteridin (XII), 6,7-Ditritiomethylpterin (XI), 6-Methyl-7-tritiomethylpterin (XI) wurden aus den entsprechend bromierten Vorstufen (XVI, XV, XVII) durch katalytischen Halogen-Tritiumaustausch mit trägerfreiem Tritiumgas im Labor von Dr. P. E. Schulze, Schering AG, Berlin hergestellt.

5 mg des Brommethylpteridins und 3 mg Katalysator (Pd/CaCO_3) wurden in einem 2,5 ml-Kolben mit Kugelschliff in 2,0 ml trockenem THF suspendiert und mit einem Magnetrührer gerührt. Nach Abziehen der Luft aus der Apparatur läßt man 2,5 Ci Tritiumgas 6 Stunden einwirken. Das Rohprodukt wurde nach 6 Stunden in 20 ml 0,1 N HCl aufgenommen und die labil gebundene Radioaktivität dreimal mit 150 ml Methanol abgezogen. Es wird anschließend zur Trockene einrotiert, in 5 ml 0,1 N HCl aufgenommen, auf Kieselgel-Dünnschichtplatten (Merck Nr. 5733) aufge-

tragen und im Laufmittel A (vgl. Tab. 2) entwickelt. Die radioaktive, fluoreszierende Bande wird abgekratzt, das Kieselgel mit heißem Wasser mehrmals extrahiert und die Lösung im Rotationsverdampfer konzentriert. Nach mehrfacher Chromatographie über Phosphozellulose (53) war das Produkt rein.

2-Amino-4-hydroxy-6,7-ditritiomethyl-5,6,7,8-tetrahydropteridin (DMPH_4 , XVIII) wurde aus XI in Ansätzen von 10 - 40 μg in 2 ml 4 N HCl nach einer von Rembold und Metzger (22) beschriebenen Methode in Ausbeuten von 75 - 80 % d. Th. hergestellt. Die spezifische Radioaktivität wurde nach der Hydrierung in der folgenden Weise überprüft:

- a) Abrotieren des Lösungsmittels,
- b) Aufnehmen in einem definierten Volumen 0,1 N HCl,
- c) Spektroskopische Konzentrationsbestimmung,
- d) Bestimmung der Radioaktivität (dpm/ml).

Die radioaktiv markierten Pteridine wurden unter Stickstoff in verdünnter, wässriger Lösung (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bei -20°C aufbewahrt und vor Gebrauch dünn-schichtchromatographisch gereinigt. Dabei zeigte sich, daß die 4-Aminogruppe der Verbindung XII bei Aufbewahrung in 0,1 N HCl nach 2 Monaten zu etwa 5 % hydrolysiert war, wobei die Verbindung XI entstanden war. 0,5 % der Radioaktivität entfielen auf weitere Verunreinigungen. Ihre Abtrennung und die der Verbindung XI von XII gelang über Phosphozellulose (Serva).

Alle Arbeiten mit Pteridinen wurden wegen der ausgeprägten Lichtempfindlichkeit dieser Stoffe unter Rotlicht ausgeführt. Bei reduzierten Pterinen muß zusätzlich sorgfältig auf Sauerstoffabschluß geachtet werden. Tetrahydropterine wurden deshalb vor Gebrauch jedesmal frisch durch katalytische Hydrierung aus den unhydrierten Vorstufen unter Edelmetallkatalyse hergestellt (22).

Sämtliche Lösungsmittel und Puffer wurden vor Gebrauch im Rotationsverdampfer entlüftet und 30 Minuten lang mit Stickstoff durchperlt, sofern nicht mit Antioxidantien wie Mercaptoäthanol gearbeitet werden konnte.

2.2. Chromatographische Methoden

Die Pteridine wurden durch Säulenchromatographie in der von Rembold und Buschmann (53) angegebenen Weise über Phosphozellulose (Serva) gereinigt.

Die Dünnschichtchromatographie (DC) diente sowohl zur präparativen Vorreinigung der markierten Pteridine als auch zur analytischen Reinheitsprüfung und Charakterisierung von Pteridinen aus biologischen Extrakten. Verwendet wurden Kieselgelplatten der Fa. Merck, Darmstadt und fünf verschiedene Laufmittel (Tab. 2).

Tab. 2: Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie (Merck, DC-Fertigplatten Kieselgel 60, Nr. 5626)

A	n-Butanol, Eisessig, Wasser	4:1:1
D	n-Propanol, 1 % Ammoniak	2:1
E	2-Propanol, 5 % Borsäure	4:1
F	Methanol, Wasser	4:1
G	Dioxan, 5 % Ammoniak	76:24

Die Tetrahydropteridine wurden wegen ihrer Sauerstoffempfindlichkeit auf Platten entwickelt, die vorher mit Mercaptoäthanol gewaschen und unter Stickstoff getrocknet worden waren. Die Platten wurden dann in den Laufmitteln A, D-G mit einem Zusatz von 0,5 % Mercaptoäthanol unter Stickstoff entwickelt. Die Pteridine wurden an Hand ihrer Fluoreszenz bei einer Anregungs-

wellenlänge von 366 nm charakterisiert.

2.3. Spektroskopische Methoden

2.3.1. UV-Spektren der Pteridine wurden im selbstregistrierenden Spektralphotometer SP 800 (Leitz-Unicam) und im Zweistrahlphotometer MPS 50 L (Shimadzu Seisakusho Ltd.) aufgenommen. Absorptionsmessungen chromatographischer Fraktionen, Konzentrations-, Protein-, Phosphat-, Crithidia- und Enzymaktivitätsbestimmungen erfolgten mit dem Spektrophotometer PMQ II (Zeiss). Die Fluoreszenz chromatographischer Fraktionen wurde mit einem Eppendorf Photometer mit Fluoreszenzzusatz bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm bestimmt.

2.3.2. NMR-Spektren der Pteridine wurden wegen ihrer geringen Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln in 1 N DCl mit internem Standard (TMS) mit einem Gerät WH 90 (Bruker-Physik, Karlsruhe) aufgenommen.

2.3.3. Massenspektren der Pteridine wurden im Direkteinlaß bei einer Verdampfungstemperatur von 200 - 250 ° C als Festproben oder nach Derivatisierung mit Bis(trimethylsilyl)acetamid in einem Massenspektrometer CH 7A (Varian-MAT, Bremen) vermessen.

2.4. Radioaktivität

Die Radioaktivität der markierten Pteridine wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler Tri Carb, Modell 3380-544 (Packard) bestimmt. Als Szintillator diente ein Gemisch aus 200 ml Methanol, 800 ml Dioxan, 100 g Naphtalin, 7,0 g PPO und 0,3 g POPOP. Die Zählausbeute betrug 30,6 % für Tritium und 84,5 % für ^{14}C . Proben mit erniedrigter Zählausbeute oder Doppelmarkierungen (^3H , ^{14}C) wurden in Verbrennungsgefäße (Combustocoones und -pads, Packard) überführt und im Proben-

verbrennungsautomaten Oxidizer Modell 306 (Packard) verbrannt. Die Verbrennungsprodukte $^3\text{H}_2\text{O}$ und $^{14}\text{CO}_2$ wurden in Szintillatorgemischen der Firma Packard (Monophase TM40, Carbosorb und Permafluor V) gezählt. Die Reproduzierbarkeit und Zähl- ausbeute der Probenverbrennung entsprachen den Spezifikationen des Herstellers.

Die Reinheit der markierten Verbindungen wurde dünnschicht- chromatographisch mit Hilfe eines Dünnschichtscanners LB 2721-2503 (Berthold) überprüft. Als Zählgas diente Methan.

2.5. Enzymbestimmungen

2.5.1. Lactatdehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) wurde nach Wroblewski und Ladue (54) bestimmt. Das Gleichgewicht der Reaktion



liegt weit auf der rechten Seite. Die LDH-Aktivität mißt man spektroskopisch bei 340 nm aus der Geschwindigkeit der NADH- Abnahme.

Reaktionsansatz: 3,0 ml Substratlösung, pH 7,5
 (50 mM Phosphat, 0,63 mM Pyruvat)
 0,05 ml NADH-Lösung
 (11 mM NADH, 10 mg NaHCO_3 /ml)
 0,1 ml Enzymlösung in geeigneter Ver-
 dünnung
 Meßtemperatur: 25 ° C

2.5.2. Saure Phosphatase (APH, EC 3.1.3.2) wurde nach Y. Ohmori (55) in der Modifikation von Osanai und Rembold (56) bestimmt. Als Substrat wurde p-Nitrophenylphosphat verwendet und die enzymatische Bildung von p-Nitrophenolat bei 405 nm ge- messen.

Reaktionsansatz: 1,0 ml Substratlösung, pH 5,5
(5,8 mM Citrat, 0,78 mM Nitrophenylphosphat)
0,025 ml Enzymlösung in geeigneter Verdünnung
2,0 ml 0,1 N NaOH zum Stoppen der enzymatischen Reaktion

Leerwert: Zusatz der Enzymlösung nach Zusatz der Lauge

Meßtemperatur: 25 ° C

Inkubationszeit: 20 Minuten

2.5.3. Inosindiphosphatase (IDP, EC 3.6.1.6)

Das Meßprinzip beruht auf der Bestimmung des aus Inosindiphosphat enzymatisch freigesetzten Phosphats (58).

Reaktionsansatz: 0,5 ml Substratlösung, pH 7,5
(5 mM Inosindiphosphat, 4 mM MgCl_2 ,
50 mM Tris-HCl)

0,05-0,1 ml Enzymlösung in geeigneter Verdünnung

Inkubationszeit: 20 Minuten

Temperatur: 37 ° C

Kontrollansatz: Inkubation ohne Inosindiphosphat

Die enzymatische Reaktion wird mit 0,5 ml 10 %iger Trichlor-essigsäure (TCE) gestoppt, das Volumen mit doppelt destilliertem Wasser auf 2,5 ml eingestellt und präzipitiertes Protein abzentrifugiert. In 2,0 ml-Aliquoten wird Phosphat nach King (59) bestimmt.

2.5.4. Cytochrom c-oxidase (EC 1.9.3.1) wird nach Cooperstein und Lazarow (57) durch Messung der Anfangsgeschwindigkeit der Oxidation von reduziertem Cytochrom c bestimmt. Es wurde der Abfall der Extinktion der α -Bande des reduzierten Cytochrom c bei 550 nm verfolgt.

Reaktionsansatz: 2,5 ml Phosphatpuffer, pH 7,0
(0,01 M K_3PO_4)

0,2 ml red. Cytochrom c-Lösung (1 %)

0,025 ml Enzymlösung in geeigneter Verdünnung

Referenzküvette: Zusatz von 0,01 ml $K_3[Fe(CN)_6]$ (0,1 M)
zur Oxidation des reduzierten Cytochrom c
vor Zugabe der Enzymlösung

2.6. Protein wurde nach der von Lowry et al. (62) angegebenen Methode mit kristallinem Rinderserumalbumin als Standard bestimmt: Ein 0,2 ml Aliquot einer Gewebefraktion wurde mit 4 ml TCE (10 %) in der Kälte gefällt, abzentrifugiert und das Sediment in 1,8 ml warmer 1 N NaOH gelöst. In chromatographischen Fraktionen wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm bestimmt.

2.7. Bindungsstudien an Serumproteinen

2.7.1. Aufbereitung der Blutproben

Frisch gewonnenes Blut wurde zwei Stunden bei 20 ° C gerinnen gelassen, anschließend zweimal bei 18000 rpm in der Kälzentrifuge zentrifugiert und gegen Standardpuffer (0,02 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,02 % NaN_3 , pH 8,0) dialysiert, um endogene Pteridine zu entfernen. Das Serum wurde im Kühlschrank bis zu zwei Stunden, bei längerer Lagerung in der Tiefkühltruhe (-20 ° C) aufbewahrt. Die maximale Lagerzeit betrug 21 Tage.

Zur Plasmagewinnung wurde Blut gegen Standardpuffer mit einem Zusatz von 0,5 % Natriumcitrat dialysiert und von Erythrocyten durch Zentrifugation abgetrennt. Humanserumalbumin, Rinderserumalbumin und Human-a-globuline wurden käuflich erworben. Rattenblut wurde durch Herzpunktion der mit Äther narkotisierten Tiere gewonnen. Plasma, Serum und Erythrocyten wurden daraus wie oben angegeben hergestellt.

2.7.2. Inkubationsbedingungen

Aliquote aus Stammlösungen der markierten Pteridine wurden eintrotiert und mit den dialysierten, entlüfteten, mit Stickstoff durch-

perlten Proteinlösungen, Serum, Plasma oder Blut bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert.

2.7.3. Nachweis der Pteridin-Protein-Wechselwirkung durch Filtration über Dextrangele

Sephadex G 200

Serum wurde in verschiedenen Mengen (2,0 - 100 ml) auf Sephadex G 200 (Pharmacia) fraktioniert. Die Säulen wurden mit Standardpuffer äquilibriert und die Ausschußgrenze mit Dextranblau bestimmt.

Sephadex G 25

Kleine Säulen verschiedener Länge (1,5 cm Ø) wurden mit 10 - 60 ml Sephadex G 25 (Pharmacia) gepackt und mit Standardpuffer äquilibriert. Nach Inkubation mit radioaktiv markierten Pteridinen wurden die Proteinlösungen unter Stickstoff auf die Säulen aufgetragen und mit Standardpuffer eluiert. Die Radioaktivität der Proteinfraction wurde als Maß für gebundenes Pteridin genommen.

2.7.4. Gleichgewichtsdialyse

Proteinlösungen wurden nach Inkubation mit radioaktiven Pteridinen in vorbereitete Dialyseschläuche (Union Carbide Nr. 8) pipettiert; diese wurden sorgfältig verknotet und in Dialysegefäße (100 ml) mit Standardpuffer gehängt, so daß die Wände des Gefäßes nicht berührt wurden. Konvektion wurde durch leichtes Rühren mit Magnetrührern erreicht. Alle Manipulationen wurden unter Rotlicht und Stickstoff durchgeführt. Die Dialysegefäße müssen beim Arbeiten mit reduzierten Pteridinen luftdicht verschlossen werden. Dialysiert wurde bei 4 ° C. Proben wurden zu verschiedenen Zeiten aus dem Außenraum entnommen und durch frischen Puffer ersetzt. Nach 8 - 10 Stunden blieb die Radioaktivität im Außenraum konstant. Trotzdem wurden die

Proben insgesamt 24 Stunden dialysiert. Kontrollen (Proben ohne Protein) dienten zur Überprüfung der Gleichgewichtseinstellung bei Ende des Versuches. Schließlich wurden Aliquote aus dem Innen- und Außenraum entnommen, die Radioaktivität und die Proteinkonzentration bestimmt.

2.8. Elektrophorese

Die Disc-Elektrophorese wurde nach Ornstein (62) in 7,5 %igen Polyacrylamidgelen durchgeführt. Die Proteinbanden wurden mit einer 0,25 %igen Lösung von Coomassie Blau gefärbt und anschließend mit einem Gemisch von 12 % TCE und 5 % Essigsäure entfärbt.

2.9. Affinitätschromatographie

6,7-DMPH₄-Agarose wurde aus unsubstituierter Sepharose 4 B (Pharmacia) durch Bromcyanaktivierung nach Cuatrecasas und Parikh (63, 64) hergestellt. Als Kupplungspuffer im letzten Schritt diente 0,1 N NaHCO₃ (pH 8,0). Die Kupplungsreaktion wurde unter Rotlicht und Stickstoff durchgeführt und mit 2,0 ml Äthanolamin nach 2 Stunden gestoppt. Die Bindungskapazität betrug 4 µmol DMPH₄/g und 12 µmol Alanin/g aktivierter Sepharose 4B. Gewaschene DMPH₄-Agarose wurde in eine mit Stickstoff gefüllte Säule gegeben und mit Serum äquilibriert. Anschließend wurde mit Startpuffer (0,02 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 2 mM 1,4-Dithioerythrit (DTE), pH 8,0) eluiert. Als Ablösepuffer diente mit Sauerstoff gesättigter Standardpuffer. Es wurde unter Licht- und Sauerstoffzutritt eine Stunde kräftig gerührt, um DMPH₄ zu oxidieren und damit spezifisch Tetrahydropterin bindende Proteine von der Affinitätsmatrix abzulösen. Mit diesem Verfahren wurden folgende Proteinfractionen gewonnen: Abgereichertes Serum, angereichertes Tetrahydropterin bindendes Protein, Kontrollserum (über unbehandelte

Sepharose 4B). Als weitere Kontrolle diente unbehandeltes Serum. Diese vier Fraktionen wurden in ihren Bindungseigenschaften miteinander verglichen.

2.10. Versuchstiere

Es wurden ca. 200 g schwere Rattenmännchen (Wistar) verwendet, denen 16 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen wurde. Die Tiere wurden dekapitiert, die benötigten Organe schnell herausgeschnitten und in eiskaltem Isolierungspuffer (0,25 M Saccharose, 0,01 M Tris-HCl, 0,001 M EDTA, pH 7,4) einige Minuten gekühlt. Anschließend wurden sie kurz mit Filterpapier getrocknet, Faszie und anhängendes Fettgewebe wurden entfernt, sie wurden gewogen und in einer berechneten Menge Isolierungspuffer mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten. Homogenisiert wurde schließlich in einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem mit Teflon-Pistill. Bei keinem dieser Schritte überstieg die Temperatur 3 ° C. Das Homogenat ist nach dem Homogenisieren etwa 25 %ig (1 Gewichtsteil Organ + 3 Gewichtsteile Isolierungspuffer).

2.11. Regionale Studien

Niere: Die gewonnenen Organe werden nach Entfernen der Nierenkapsel, des anhängenden Fettgewebes und der Faszie mit einem scharfen Messer längs geteilt und Rindenzone, Mark und Nierenbeckengewebe voneinander separiert. Das Gewebe des Nierenbeckens wird verworfen.

Gehirn: Das Gehirn wird nach Entnahme und ausreichender Kühlung auf eine eiskalte Glasplatte gelegt und nach der von Glowinski und Iversen (65) angegebenen Methode in folgende anatomische Strukturen zerlegt: Cerebellum, Medulla oblongata und Pons, Hypothalamus, Mittelhirn, Hippocampus, Corpus striatum und Cortex. Die Reproduzierbarkeit der Präparation wurde durch

Wägung ermittelt (Tab. 3):

Tab. 3: Reproduzierbarkeit der Gehirnpräparation (Ratte).
Mittelwerte von 11 Gehirnen (mg Feuchtgewicht).
SD=Standardabweichung.

Anatomische Struktur	Feuchtgewicht (mg)	SD
Cerebellum	270	27
Medulla obl.+Pons	197	30
Hypothalamus	49	12
Mittelhirn	170	40
Hippocampus	148	5
Corpus striatum	124	31
Cortex	765	72

Die örtliche Beziehung der verschiedenen Regionen zeigt die Abbildung 3. Einige dieser Areale enthalten mehr als eine bestimmte anatomische Region. Die funktionellen und anatomischen Beziehungen sind eingehend bei Koennig und Klippel (66) beschrieben.

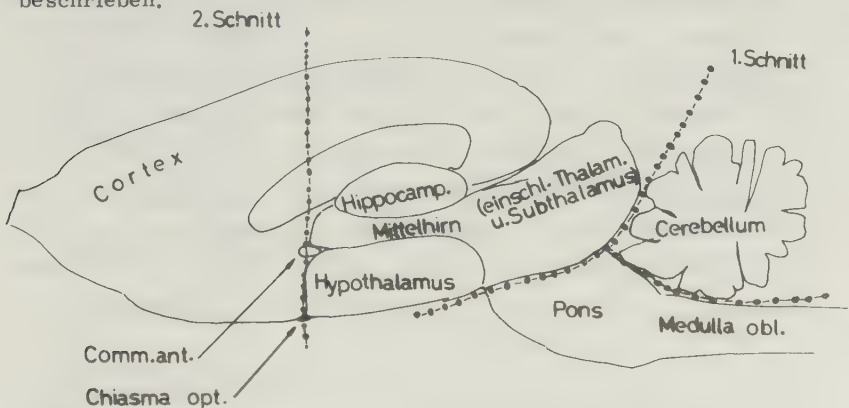


Abb. 3: Schematische Darstellung der Präparation des Rattengehirns nach Glowinski und Iversen (65). Gepunktete Linien zeigen die Hauptschnitte.

2.12. Gewebefraktionierung

2.12.1. Differentialzentrifugation

Die subzelluläre Fraktionierung der verschiedenen Organe erfolgte in der von de Duve et al. (67) angegebenen Weise mit der Ausnahme, daß die P-Fraktion nur einmal, alle übrigen Fraktionen zweimal mit dem Isolierungspuffer gewaschen wurden. Die Endverdünnung der cytosolischen Fraktion betrug etwa 1:40. Fraktionen und ihre Symbole sind in Tabelle 4 angegeben. Zur Charakterisierung der angewandten Zentrifugalkräfte diente K ($g \cdot \min \cong \int g \, dt$).

Tab. 4: Subzelluläre Fraktionierung von Leber, Niere und Gehirn der Ratte

Gewebefraktion	Symbol	K (g·min)	Bemerkungen
Homogenat	H	--	25 %
Cytoplasm, Extrakt	Ü	6 000	Überstand
Kernfraktion	N	6 000	<u>Sediment</u> Debris, unaufgebrochene Zellen, Zellkerne
Mitochondrien	M	33 000	schwere mitoch. Fraktion intakte Mitochondrien
Lysosomen	L	250 000	lysosomale Fraktion leichte Mitochondrien
Mikrosomen	P	5000 000	mikrosomale Fraktion rauhes und glattes endoplasm. Reticulum
Cytosol	S	5000 000	Überstand; Zellsaft

Zur näheren Charakterisierung wurden von jeder Fraktion folgende Parameter bestimmt: Fraktionsvolumen, Proteinkonzentration, Leitenzymaktivitäten, Biopterinkonzentration. Zur Kontrolle wurde das Homogenat von Leber, Niere und Gehirn der Ratte mit 2-¹⁴C-Biopterin (10^{-6} M) inkubiert und nach dem angegebenen Schema aufgearbeitet.

2.12.2. Synaptosomendarstellung

Die synaptosomale Fraktion wurde in der von Gray und Whittaker (68) angegebenen Weise aus der rohen mitochondrialen Fraktion des Gesamthirnhomogenats durch Fraktionierung über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten gewonnen und biochemisch durch folgende Größen charakterisiert: Proteinkonzentration, Fraktionsvolumen, Biopterinkonzentration, LDH-, APH- und Cytochrom c-Oxidaseaktivität. Die mitochondriale Fraktion der Leber wurde zur Kontrolle in der gleichen Weise untersucht.

2.12.3. Dichtegradientenzentrifugation

Die Bindung von ¹⁴C-Tetrahydrobiopterin an Proteine von Leber-, Nieren-, Gehirnhomogenat und von subzellulären Fraktionen wurde in der folgenden Weise untersucht:

2 ml Homogenat oder subzelluläre Fraktion wurden 20 Minuten mit 2-¹⁴C-BH₄ bei 25 ° C inkubiert und anschließend über einen linearen Dichtegradienten fraktioniert (0,25 bis 1,5 M Saccharose). Nach der Zentrifugation (180 min, 20000 rpm, Rotor: SW 27.1, Beckman) wurden 0,5 - 1,0 ml Fraktionen gesammelt und die üblichen Parameter bestimmt.

2.12.4. Auswaschversuche

Die Gewebekomogenate wurden nach dem beschriebenen Schema aufgearbeitet mit der Abweichung, daß auf das Waschen der Fraktionen verzichtet wurde. Nach der Isolierung der rohen subzellu-

lären Fraktionen wurden sie dreimal mit 5 ml (Leber) bzw. 4 ml (Niere, Gehirn) Isolierungspuffer gewaschen, resuspendiert und zentrifugiert. In allen Fraktionen wurden Protein- und Biopterinkonzentrationen bestimmt. Ein Teil der Ausgangsfraktion war vorher mit $2\text{-}^{14}\text{C-BH}_4$ inkubiert worden und wurde zur Kontrolle nach dem obigen Schema aufgearbeitet. Aliquote dieser Proben wurden im Oxidizer Modell 306 (Packard) verbrannt und ihre Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

2.12.5. Einbauversuche

Leber- und Nierenzellorganellen (N, M, L) wurden durch Differentialzentrifugation in der angegebenen Weise gewonnen und charakterisiert. Sie wurden im Isolierungspuffer suspendiert und mit verschiedenen Konzentrationen radioaktiven Tetrahydrobiopterins inkubiert. Nach Ablauf der gewählten Inkubationszeit wurde der Einbau durch rasches Abzentrifugieren unterbrochen, der Überstand dekantiert, das Sediment zweimal mit Äthanol gewaschen und im Isolierungspuffer resuspendiert. In den resultierenden Fraktionen wurden wieder Volumen, Protein- und Biopterinkonzentration bestimmt.

Inkubationsansatz: 2,5 ml Isolierungspuffer, pH 7,4

2,0 ml Gewebefraktion

0,5 ml $^{14}\text{C-BH}_4$ in Isolierungspuffer

Temperatur: 4° , 25° und 37°C

2.13. Crithdiatest

Crithidia fasciculata (ATCC 12857) wurde bei Raumtemperatur im Erhaltungsmedium nach Guttman (69) gezüchtet und wöchentlich in frisches Medium transferiert. Die Biopterinmenge wurde aus dem Wachstum des Flagellaten in Form einer Dosis-Wirkungsbeziehung nach Kidder und Dutta (70) bestimmt. Impfkulturen für den quantitativen Crithdiatest wurden in folgender

Weise hergestellt: 2 ml Crithidiazellen im Erhaltungsmedium wurden in 15 ml eines biopterinfreien Basalmediums transferriert. Sie wurden in diesem Medium 4 Tage gezüchtet, um endogenes Biopterin zu erschöpfen. Von dieser Stammlösung wurden schließlich 50 µl je Testgläschen zur Inokulation verwendet. Dadurch wird ein Transfer von Biopterin aus dem Erhaltungsmedium ins Testmedium vermieden.

Standardwachstumskurve

Zu 8 ml des biopterinfreien Basalmediums (siehe Anhang, S. 96) werden steigende Mengen einer Biopterinstammlösung (0,1 ng/ml) pipettiert und mit doppelt destilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt, so daß je drei Proben 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 und 50 pg Biopterin/ml enthalten.

Aliquote biologischer Proben (Gewebe, Serum, Harn) wurden in einem t-Aconitsäurepuffer (5 g t-Aconitsäure/l, pH 4,5) suspendiert und autoclaviert. Ausgefallenes Protein wurde durch Zentrifugieren präzipitiert, der Überstand entnommen und mit doppelt destilliertem Wasser weiter verdünnt. Kontrollversuche mit ^{14}C -Biopterin stellten sicher, daß Biopterin mit dieser Methode aus biologischen Proben nahezu quantitativ ($97 \pm 1,5\%$) freigesetzt wird. Aliquote der geeignet verdünnten Proben wurden zu 8 ml Basalmedium gegeben, mit destilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt und nach Autoclavieren mit 50 µl der Impfkultur inokuliert. Nach Inkubation (4 Tage bei 28°C) in einem Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific Comp.) wurde das Wachstum der Crithidiazellen an Hand der Extinktion bei 650 nm oder durch Bestimmung der Zellzahl mit einem TOA Microcellcounter CC 117 (Colora, Lorch) gemessen. Die Extinktion bei 650 nm ist im betrachteten Bereich der Zellzahl linear proportional (Abb. 4). Eine typische Standardwachstumskurve zeigt die Abbildung 5.

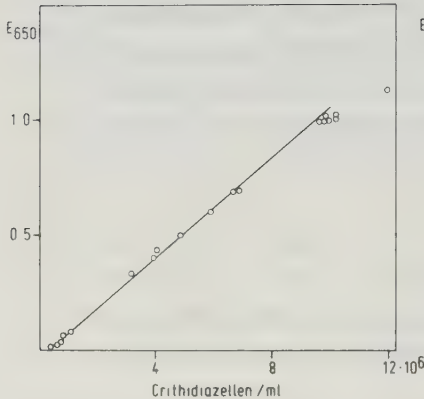


Abb. 4: Abhängigkeit der Ex-
tinktion (E_{650}) des Basalme-
diums von der Zahl der
Crithidiazellen pro ml.

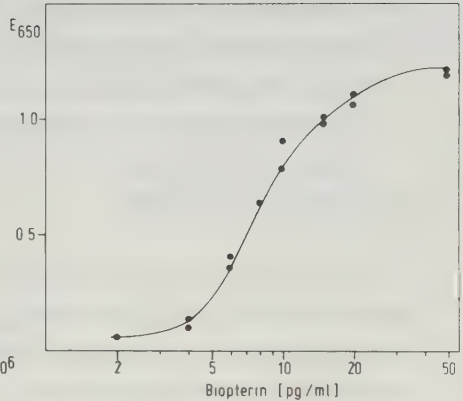


Abb. 5: Stimulierende Wirkung
von Biotin (III) auf das Wachs-
tum (E_{650}) von *Crithidia fascicu-*
lata (Standardwachstumskurve).

2. 14. Ganztierautoradiographie

Männliche Wistarratten von 150 g Gewicht erhielten eine einma-
lige Injektion von $5 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C-BH}_4$ über die Schwanzvene in 1,0 ml
physiologischer Kochsalzlösung. Nach 4 bzw. 16 Stunden wurden
die Tiere durch Tieffrieren in Aceton-Trockeneis getötet und nach
Einbetten in Schabefleisch im Kryostaten bei -20°C in $40 \mu\text{m}$ dik-
ke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden auf Klebeband
(Scotch Tape) aufgezogen und bei -20°C gefriergetrocknet. An-
schließend wurde ein Röntgenfilm (Kodak 13 x 18) aufgelegt und
nach 40 Tagen Expositionszeit entwickelt.

2.15. Sonstige Methoden

pH-Werte wurden mit einer Einstabelektrode der Firma Radiometer (Kopenhagen) gemessen. Die Isolierung der subzellulären Fraktionen erfolgte mit einer High Speed 18 Kühlzentrifuge (MSE) und einer Ultrazentrifuge Spinco L2 (Beckman).

2.16. Berechnung, Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die in den Gleichungen (1a)-(8) verwendeten Symbole haben die folgenden Bedeutungen:

A_X	-	Proteinmenge der Fraktion X (mg)
A_H	-	Gesamtproteinmenge des Homogenats (mg)
rA_X	-	relativer Anteil des Proteins der Fraktion X am Gesamtprotein (%)
R	-	Ausbeute (%)
X	-	Subzelluläre Fraktionen (H, Ü, N, M, L, P, S), vgl. Tab. 4
c	-	Konzentration c_{Bio} - Biopterinkonzentration (mM) c_{Prot} - Proteinkonzentration (mg/ml)
Δ^t	-	Meßzeitintervall (min)
V_o	-	Volumenaktivität ($\Delta c / \Delta t$)
E	-	Extinktionsänderung
V	-	Testvolumen V_X - Gesamtvolumen der Gewebefraktion X
v	-	Probevolumen (ml)
ϵ	-	Extinktionskoeffizient ($cm^2 / \mu mol$)
d	-	Schichtdicke (cm)
B_X	-	Gesamtenzymaktivität der Fraktion X (U)
B_H	-	Gesamtenzymaktivität (U)
rB_X	-	Relativer Anteil der Enzymaktivität der Fraktion X an der Gesamtenzymaktivität
SA_X	-	Spezifische Aktivität der Fraktion X (U/mg Protein)
RSA_X	-	Relative spezifische Aktivität der Fraktion X
C_X	-	Gesamtbioplerinmenge der Fraktion X (pmol)
C_H	-	Gesamtmenge Biopterin (pmol)
rC_X	-	Relativer Anteil der Fraktion X am Gesamtbioplerin
SB	-	Spezifische Bindung (nmol/g Protein)

2.16.1. Die Proteinkonzentration wurde in der beschriebenen Weise bestimmt. Die folgenden Größen wurden daraus berechnet:

$$(1a) \quad A_X = c_{\text{Prot}} \cdot V_X \quad (\text{mg})$$

$$(1b) \quad A_H = \sum A_{N, M, L, P, S} = \sum A_{N, \ddot{U}} \quad (\text{mg})$$

$$(1c) \quad rA_X = (A_X / \sum A_{N, \ddot{U}}) \cdot 100 \quad (\%)$$

$$(1d) \quad R = (\sum A_{N, M, L, P, S} / \sum A_{N, \ddot{U}}) \cdot 100 \quad (\%)$$

2.16.2. Die Volumenaktivität V_o der Enzyme wird nach einem Vorschlag von Bergmeyer (71) in der folgenden Weise definiert:

$$(2) \quad V_o = \Delta c / \Delta t = \frac{E \cdot V \cdot 1000}{t \cdot v \cdot d \cdot \epsilon} \quad (\text{U/l}) \text{ bzw. } (\mu\text{mol l}^{-1} \text{ min}^{-1})$$

$$(2a) \quad \text{LDH } V_o = \frac{E_{340} \cdot 3,15 \cdot 1000}{t \cdot 0,1 \cdot 6,22} \quad (\text{U/l})$$

$$(2b) \quad \text{APH } V_o = \frac{E_{405} \cdot 3,025 \cdot 1000}{t \cdot 0,025 \cdot 18,5} \quad (\text{U/l})$$

$$(2c) \quad \text{IDP } V_o = \frac{c_{\text{Pi}}}{t} \quad (\mu\text{mol Phosphat} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$$

$$(2d) \quad \text{Cytochrom-Oxidase} \\ V_o = \frac{E_{550} \cdot 2,75}{t \cdot 0,025} \cdot (E_{550} / \text{min})$$

Die Auswertung der Volumenaktivität erfolgte dann nach:

$$(3a) \quad B_X = V_o \cdot V_X \quad (\text{U})$$

$$(3b) \quad B_H = \sum B_{N, M, L, P, S} = \sum B_{N, \ddot{U}} \quad (\text{U})$$

$$(3c) \quad rB_X = (B_X / \sum B_{N, \ddot{U}}) \cdot 100 \quad (\%)$$

$$(3d) \quad SA_X = B_X / A_X \quad (\text{U/mg Protein})$$

$$(3e) \quad RSA_X = rB_X / rA_X$$

2.16.3. Die Biopterinverteilung auf die einzelnen Fraktionen wird in der prinzipiell gleichen Weise beschrieben:

$$(4a) \quad C_X = c_{\text{Bio}} V_X \quad (\text{pmol})$$

$$(4b) \quad C_H = \sum C_{N, M, L, P, S} = \sum C_{N, U} \quad (\text{pmol})$$

$$(4c) \quad rC_X = (C_X / \sum C_{N, U}) \cdot 100 \quad (\%)$$

$$(4d) \quad SA_X = C_X / A_X \quad (\text{pmol/mg Protein})$$

$$(4e) \quad RSA_X = rC_X / rA_X$$

Die relative spezifische Aktivität des Homogenats (RSA_H) ist definitionsgemäß 1,0.

2.16.4. Gleichgewichtsdialyse (47)

Die Pteridinkonzentration im inneren und äußeren Kompartiment läßt sich aus der absoluten gemessenen und der bekannten spezifischen Radioaktivität berechnen:

$$(5) \quad c_{\text{Pteridin}} = \frac{\text{dpm}}{2,22 \cdot 10^6 \cdot A} \quad (\text{mM})$$

(A - spezifische Radioaktivität, Ci/mol)

Die Konzentration gebundenen Pteridins ist dann

$$(6) \quad c_{\text{gebunden}} = c_{\text{innen}} - c_{\text{außen}} \quad (\text{mM})$$

$$(6a) \quad c_{\text{frei}} = c_{\text{außen}}$$

Die spezifische Bindung wird durch folgenden Ausdruck dargestellt:

$$(7) \quad SB = \frac{c_{\text{gebunden}}}{c_{\text{Protein}}} \quad (\text{nmol gebunden/mg Protein})$$

Die Bindung der Pteridine an Proteine wird dann durch Auftragen der Konzentration freien Pteridins (Abszisse) gegen die spezifi-

sche Bindung (Ordinate) dargestellt. Zur Überprüfung der Versuchsergebnisse der Gleichgewichtsdialyse diente die Ausbeute R (%):

$$(8) \quad R = \left[\frac{(\text{dpm/ml})_{\text{außen}} \cdot V_{\text{außen}} + (\text{dpm/ml})_{\text{innen}} \cdot V_{\text{innen}}}{(\text{dpm})_{\text{gesamt}}} \right] \cdot 100$$

Ergebnisse mit schlechterer Ausbeute als $100 \pm 10 \%$ wurden nicht ausgewertet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Synthese ^3H -markierter Pteridine hoher spezifischer Radioaktivität

3.1.1. Modellsubstanzen und Synthesewege

Für die Synthese tritiummarkierter Pteridine hoher spezifischer Aktivität wurden zwei Modellsubstanzen ausgewählt:

6, 7-Dimethylpterin (XI)

Diese Verbindung ist ein Analogon der in der Natur weit verbreiteten 6-Polyhydroxyalkylpterine und wird in seiner voll reduzierten Form (DMPH_4 , XVIII) oft als Kofaktorersatz für mischfunktionelle Oxygenasen bei in vitro Studien verwendet. DMPH_4 (XVIII) ist durch katalytische Reduktion von XI mit H_2/PtO_2 in 70 %iger Ausbeute leicht zugänglich.

2, 4-Diamino-6, 7-dimethylpteridin (XII)

Die Substanz hat strukturelle Ähnlichkeit mit dem bekannten Cyto-staticum Methotrexat (29) und mit dem Diureticum Triamteren (28) und wirkt stark diuretisch.

Stabile Positionen für einen Austausch mit Tritium wird man in den beiden Verbindungen (XI und XII) nur in den Methylgruppen 6 und 7 erwarten. Im Reaktionsschema (Abb. 6) sind die Wege angegeben, die sich für eine Synthese der entsprechenden ^3H -markierten Pteridine anbieten.

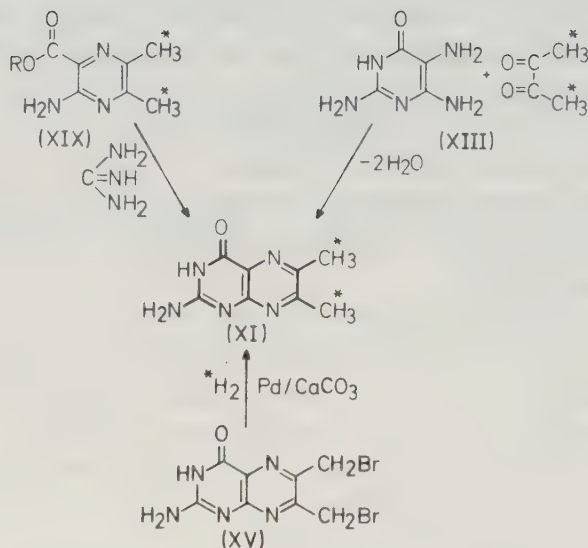


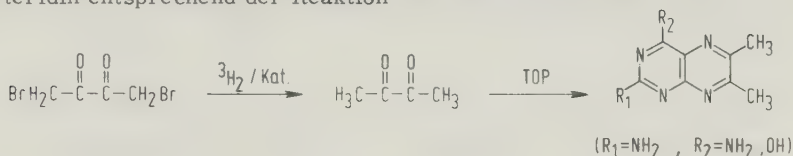
Abb. 6: Mögliche Wege zur Synthese verschiedener deuterierter und tritierter Dimethylpteridine aufgezeigt am Beispiel des 6,7-Dimethylpterins (XI)

Der Weg XIX-XI setzt die Synthese eines bereits in den Methylgruppen markierten Pyrazins (XIX) voraus, das in einem folgenden Schritt mit Guanidin zum Pteridin cyclisiert wird. Wegen der allgemein schweren Zugänglichkeit der Pyrazine wird dieser Syntheseweg selten begangen. Der andere Weg geht vom substituierten Aminopyrimidin (XIII-XI) aus, das mit einem geeigneten vicinalen Diketon zum Pteridin kondensiert wird (51). Diese als Isay-Reaktion bekannte Methode verläuft glatt und mit guten Ausbeuten zum symmetrisch substituierten Pteridin. Der dritte Weg (XV-XI) geht von den Brommethylpteridinen aus, die durch katalytischen Brom-Wasserstoffaustausch zu den korrespondierenden

Pteridinen umgesetzt werden. Diese Methode hat den Vorzug, daß die Radioaktivität erst im letzten Syntheseschritt in das Molekül eingebaut wird. Ganz allgemein versucht man, bei der Synthese radioaktiv markierter Verbindungen mit möglichst wenigen radioaktiven Zwischenstufen auszukommen. Diese Voraussetzung gilt auch für die hier beschriebenen Synthesen. Es wurden deshalb die Wege XIII-XI und XV-XI näher untersucht.

3.1.2. Synthese ^3H -markierter Pteridine, von tritiiertem Diacetyl ausgehend (Weg XIII-XI)

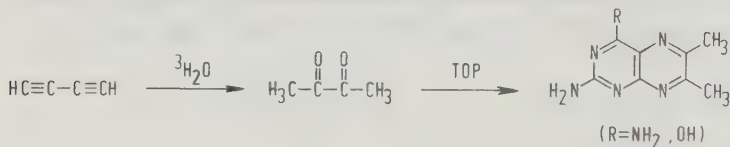
a) Die Synthese von Diacetyl durch katalytischen Brom-Wasserstoff-Austausch mit anschließender Kondensation zum markierten Pteridin entsprechend der Reaktion



brachte keine befriedigenden Ergebnisse, da die Hydrierung nicht zu eindeutigen Produkten führte. Kernresonanzspektren, zu verschiedenen Zeiten vom Beginn der Hydrierung an aufgenommen, zeigten schon kurz nach dem Start der Reaktion die Bildung eines Gemisches verschiedener Produkte (u.a. Diacetyl, Monobromdiacetyl, Acetoin und Butandiol). Um möglichst hohe spezifische Radioaktivität zu erhalten, mußte die Hydrierungsreaktion in aprotischen Lösungsmitteln (THF) durchgeführt werden. Die anschließende Kondensationsreaktion war wegen der Unlöslichkeit des substituierten Pyrimidins in THF behindert. Auch die Abtrennung des gebildeten Diacetyls durch Bisulfitaddition war unter den anzuwendenden Reaktionsbedingungen nicht erfolgreich. Die Ausbeuten lagen nur bei 0 - 3 % der Theorie.

b) Hydratisierung von Diacetylen

Die Hydratisierung von Diacetylen oder Monovinylacetylen (IX, VIII) unter HgO-Katalyse führt zur Quecksilberadditionsverbindung des Diacetyls X, die durch konzentrierte HCl gespalten werden kann. Das Diketon kann in einem anschließendem Reaktionsschritt zum 6, 7-Dimethylpteridin cyclisiert werden:



In Vorversuchen konnten unter den Bedingungen der Radiosynthese Pteridine in guter Ausbeute hergestellt werden. Mit D₂O (99,7 % D) und ³H₂O (10 und 100 Ci/mol wurden dann die Verbindungen XI, XII und XVIII in deuterierter und tritierter Form synthetisiert.

Tab. 5: Hydratisierung von Diacetylen (IX) mit ³H₂O

Reaktionsansatz: 1,4 mmol IX; 0,4 mmol HCl; 0,5 mmol HgO; 0,3 mmol H₂SO₄; 5 mmol H₂O; 0,4 mmol XIII bzw. XIV

Pteridin	Spezifische Aktivität (Ci/mol)		Ausbeute (%)
	³ H ₂ O	Pteridin	
XI	10	1,8	86
XI	100	18,1	94
XVIII	100	18,1	67
XII	100	11,3	61

Setzt man "kaltes" Diacetyl (X) in deuteriertem oder tritiiertem Wasser mit dem entsprechend substituierten Pyrimidin (XIII, XIV) zum Pteridin um, findet man Deuterium und Tritium nur in Form labil gebundener Aktivität eingebaut. Vermutlich sind

während der Kondensationsreaktion nur die Protonen am Stickstoff einem Austausch zugänglich.

3.1.3. Isotopeneffekt des Deuterium- und Tritiumeinbaues

Die spezifische Markierung des Pteridins XI ist geringer als der Isotopengehalt des zur Hydratisierung von Diacetylen (Weg XIII-XI) verwendeten Wassers. So werden nur 61 bzw. 23 % der berechneten Aktivität von $^2\text{H}_2\text{O}$ bzw. $^3\text{H}_2\text{O}$ im Pteridin eingebaut. Der Einbau von Deuterium in die Methylgruppen der Verbindung XI steigt bis zu einem Gehalt von etwa 80 % D_2O linear mit steigendem Deuteriumgehalt des Wassers an (Abbildung 7).

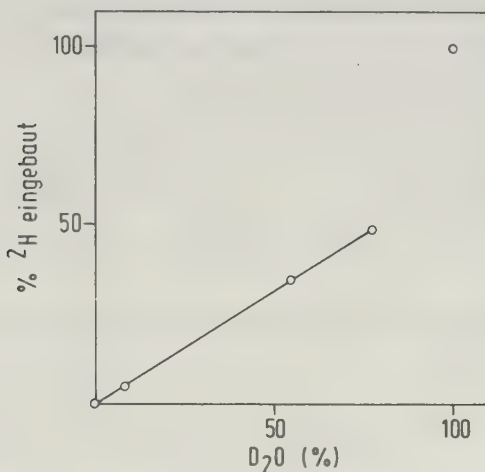


Abb. 7: Einbau von ^2H in die Methylgruppen von 6,7-Dimethylpterin (XI). Methode: Hydratisierung von Diacetylen mit $^2\text{H}_2\text{O}$ und Kondensation des gebildeten Diacetyls mit XIII.

3.1.4. Stabilität der Methylgruppen gegen HD- und HT-Austausch

Die Massenspektren der auf Weg XIII-XI synthetisierten Pteridine (XI, XII, XVIII) weisen eine uneinheitliche Isotopenverteilung in den Methylgruppen auf. Nach Abzug der labil gebundenen Aktivität

liegt ein Gemisch der nichtdeuterierten und der mono- bis hexadeuterierten Pteridine vor. Diese Verteilung ist aber gegen Austausch mit wässrigem Lösungsmittel stabil.

Löst man umgekehrt die Pteridine XI und XII in 1,0 N DCl und nimmt über 56 Stunden NMR-Spektren auf, findet man ebenfalls keine Veränderung im Verhältnis der Methylgruppen zueinander, die auf einen HD-Austausch zurückgeführt werden kann.

3.1.5. Synthese ^3H -markierter Pteridine aus bromierten Vorstufen (Weg XV - XI)

Die Synthese radioaktiv markierter Pteridine auf Weg XIII-XI (Abb. 6) zeigte zwar die Stabilität der Markierung in den Methylgruppen, führte aber aus praktischen Gründen nicht zu den gewünschten spezifischen Radioaktivitäten.

Die Umsetzung der bromierten Pteridine (XV, XVI, XVII) mit trägerfreiem Tritiumgas auf Weg XV-XI (Abb. 8) unter Pd-Katalyse gelang dagegen glatt und in genügender Ausbeute. In der Tabelle 6 sind die Ergebnisse dieser Experimente angegeben.

Tab. 6: Synthese von ^3H -Pteridinen durch katalytischen Brom-Tritium-Austausch

Brommethylpteridin	^3H -Pteridin	Spez. Radioakt. (Ci/mol)	Ausbeute (%)
XVI	XII	5300	36
XV	XI	3900	18
XVII	XI	3300	23

Die ^3H -Pteridine wurden nach Reinigung über Kieselgeldünnschichtplatten durch ihren R_f -Wert in den angegebenen Systemen (A, D-G, Tab. 2) und durch ihre UV-Spektren charakterisiert.

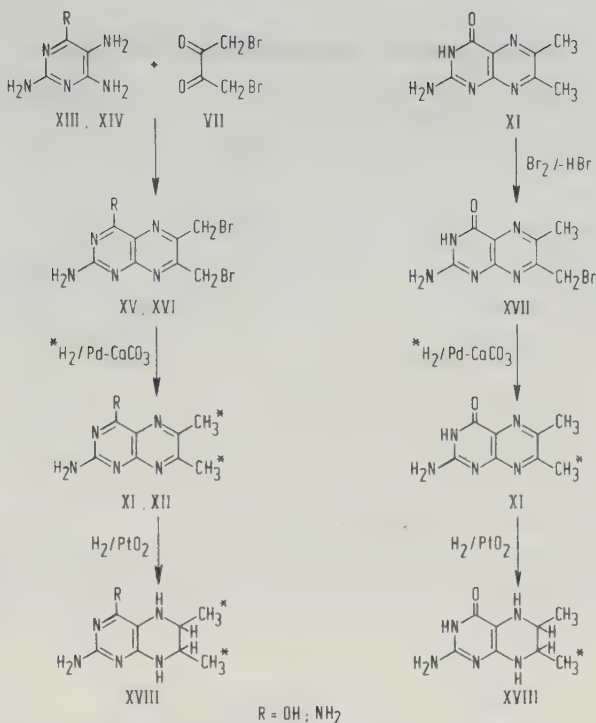


Abb. 8: Synthese deuterierter und tritierter Pteridine (XI, XII, XVIII) durch katalytischen Brom-Wasserstoffaustausch aus Brommethylpteridinen.

3.2. Charakterisierung der Brommethylpteridine

Die Brommethylpteridine sowie einige Referenzsubstanzen wurden durch ihre UV-, NMR-, Massenspektren und dünn-schicht-chromatographisch charakterisiert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 8 - 10 und der Abbildung 9 aufgeführt.

Tab. 7: UV-Spektren der Brommethylpteridine

Brommethylpteridin	$\lambda_{\max}$	$(\epsilon_{\max} \cdot 10^{-3})$	Lösungsmittel
XV	348 (8, 9)	257 (10, 9)	1 N HCl
	375 (5, 8)	262 (14, 2)	1 N NaOH
XVI	335 (8, 7)	261 (9, 3)	1 N HCl
	374 (2, 8)	256 (6, 5)	1 N NaOH

Tab. 8: NMR-Spektren der Brommethylpteridine (ppm).

Pteridin	6, 7-CH ₃	6, 7-CH ₂ Br	NH	Lösungsmittel
XVI	-	4, 97	8, 75 7, 70	DMSO
XV	-	4, 82 4, 91	9, 34 9, 23	DMSO
XI	2, 69 2, 66	-	-	1 N DCI
XII	2, 50	-	6, 42 7, 42	DMSO
XII	2, 70 2, 65	-	-	1 N DCI

Tab. 9: Dünnschichtchromatographie (DC)

R_f-Werte der Brommethylpteridine und einiger Vergleichssubstanzen auf Kieselgel-Dünnschichtplatten. Einzelheiten s. exp. Teil.

Pteridin	<u>Laufmittel</u>				
	A	B	E	F	G
Biopterin (III)	0, 4	0, 38	0, 53	0, 69	0, 18
Xanthopterin ^a	0, 57	0, 37	0, 54	0, 69	0, 09
Isoxanthopterin ^b	0, 36	0, 41	0, 49	0, 56	0, 16
XV	0, 78	0, 79	0, 73	0, 77	0, 65
XVI	0, 69	0, 71	0, 77	0, 86	0, 71
XVII	0, 75	0, 77	0, 67	0, 69	0, 76
XI	0, 34	0, 26	0, 25	0, 67	0, 32
XII	0, 49	0, 28	0, 55	0, 73	0, 52

a) 6-Hydroxypterin

b) 7-Hydroxypterin

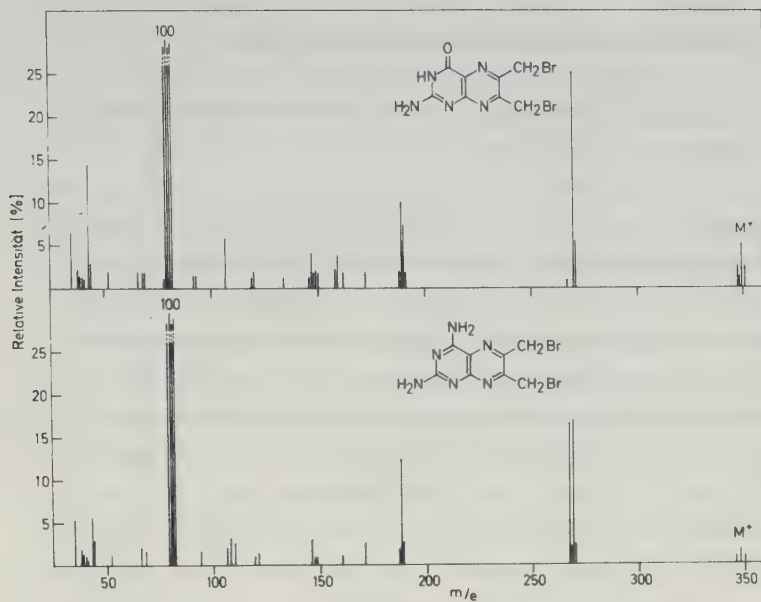


Abb. 9: Massenspektren der Brommethylpteridine

Die Proben wurden unterivatisiert als Festproben vermessen.

Verdampfungstemperatur: 200 - 250 ° C.

3.3. Kompartimentierung von Biopterin im Säuger

3.3.1. Regionale Verteilung von Biopterin (Crithidiaaktivität) in der Ratte

Der Säugetierorganismus kontrolliert seinen funktionellen Bestand an reduziertem Kofaktor und schirmt ihn normalerweise gegen mögliche Störgrößen ab. Diese Hypothese ergibt sich aus den Befunden einer Reihe von Arbeitsgruppen, die nachgewiesen haben, daß die Gewebespiegel des Kofaktors zwar speziesabhängig unterschiedlich, innerhalb einer Art aber erstaunlich konstant sind (72, 73, 74). So ist Biopterin (Crithidiaaktivität) in verschiedenen Organen (vor allem in der Leber) gegenüber den extrazellulären Flüssigkeiten angereichert. In Tabelle 10 sind die mikrobiologisch bestimmten Konzentrationen des Kofaktors in verschiedenen Organen der Ratte angegeben.

Tab. 10: Biopterinkonzentration ($\mu\text{mol/kg}$ Feuchtgewicht bzw. $\mu\text{mol/l}$) verschiedener Organe und Körperflüssigkeiten der Ratte (Crithidiaaktivität). n = Anzahl der Bestimmungen.

Organ	$c_{\text{Biopterin}}$	SD	n
Leber	4,6	0,80	6
Milz	2,29	0,57	4
Niere	1,03	0,43	21
Nierenrinde	1,20	0,35	10
Nierenmark	1,10	0,33	10
Herz	0,13	0,02	4
Erythrocyten	0,55	-	2
Blut	0,25	0,04	4
Plasma	0,11	0,025	7

Bioppterin ist offenbar intrazellulär funktionell kompartmentiert. Der Konzentrationsgradient zwischen den intrazellulären und extrazellulären Räumen wird durch unbekannte Mechanismen aufrechterhalten, und muß deshalb eine physiologische Bedeutung haben. Trennt man nämlich das Gehirn der Ratte nach Glowinski und Iversen (65) weiter auf, findet man die Crithidiaaktivität spezifisch in Gehirnabschnitten angereichert, in denen die physiologische Funktion der Katecholamine und des Serotonins als Neurotransmitter nachgewiesen wurde (75, 76), während die Großhirnrinde eine vergleichsweise geringe Konzentration enthält. Der Hypothalamus ist die Hirnregion mit dem höchsten Bioppteringehalt (Tab. 11).

Tab. 11: Regionale Verteilung von Bioppterin (Crithidiaaktivität) im Gehirn der Ratte.
(Mittelwerte von 11 Tieren $\pm$ SD).

Anatomische Region	c _{Bioppterin} (μ mol/kg)	SD
Gehirn (gesamt)	0,25	0,08
Hypothalamus	0,49	0,11
Mittelhirn	0,25	0,09
Corpus striatum	0,22	0,02
Cerebellum	0,18	0,07
Medulla oblongata und Pons	0,18	0,09
Hippocampus	0,13	0,07
Cortex	0,07	0,02

Der Crithdiatetest unterscheidet nicht zwischen den einzelnen Oxidationsstufen (BH_4 , BH_2 und B) des Bioppters. Der Säugetierorganismus ist aber nach Befunden von Rembold et al. (46) in der Lage, zwischen i. p. injiziertem Bioppterin und Tetrahydrobioppterin

zu diskriminieren. Nur der enzymatisch aktive Kofaktor (BH_4) wird retiniert, während Biopterin überwiegend renal eliminiert wird.

3.3.2. Regionale Verteilung von ^{14}C - BH_4 in der Ratte

Die Verteilung der Radioaktivität nach i. v. -Injektion von ^{14}C -Tetrahydrobiopterin ist in der Ratte ungleichförmig. Nach Abbildung 10 kann peripher parenteral zugeführtes BH_4 offensichtlich nicht die Blut-Hirnschranke überwinden, da keinerlei Inkorporation der Radioaktivität im Gehirn oder im Rückenmarkskanal gefunden wird. Die Radioaktivität wird hauptsächlich in der Leber eingebaut. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Einbau um einen spezifischen Transportprozeß, wie eine Überschlagsrechnung zeigt. 5 μCi injiziertes BH_4 entsprechen 0,1 μmol . Bei einem geschätzten Extrazellulärvolumen von 30 % des Körpergewichts ergäbe sich bei gleichförmiger Verteilung des Pterins bei den verwendeten Ratten von 150 g Körpergewicht eine Kofaktorkonzentration von etwa 2 $\mu\text{mol/l}$. Demgegenüber wurde die Konzentration crithidiaaktiver Substanzen in der Leber zu 4,6 $\mu\text{mol/kg}$ bestimmt, so daß 2- ^{14}C - BH_4 gegen einen Konzentrationsgradienten eingebaut wurde.

Daneben findet man eine beträchtliche Markierung des Magen-Darmtraktes und der Niere. Die Nierenrinde und das Nierenbecken sind im Gegensatz zur Markzone stark geschwärzt. Die streifige Struktur des anatomischen Nierenaufbaus wird sehr gut deutlich. Eine Erklärung für diese Verteilung in der Niere wird im Zusammenhang mit Transport- und Clearancestudien an diesem Organ auf Seite 83 diskutiert.

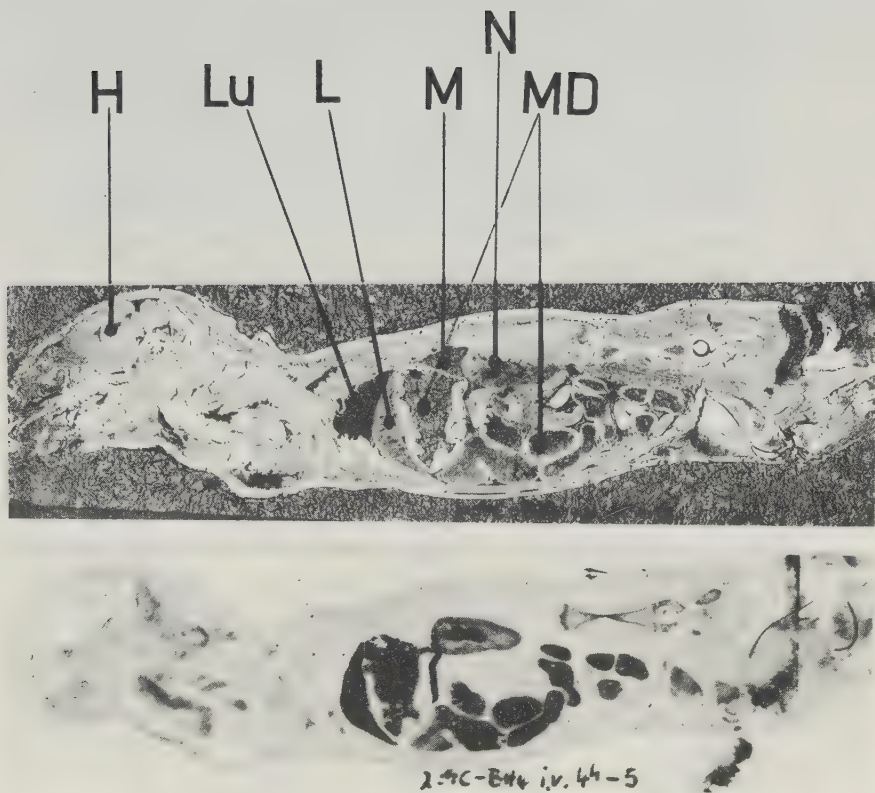


Abb. 10: Regionale Verteilung von 5 $\mu\text{Ci } 2^{14}\text{C-BH}_4$ in der Ratte 4 Stunden nach i.v.-Injektion in die Schwanzvene. Oben: Histologischer Schnitt, unten: Schwärzung des Röntgenfilms. Symbole : H-Gehirn, L-Leber, M-Milz, N-Niere, MD-Magen-Darmtrakt, Lu-Lunge. Maßstab: etwa 1:2

3.4. Kontrolle des Biopterinbestandes im Säuger

3.4.1. Transport- und Verteilungsfunktion des Blutes

Die unterschiedliche Behandlung der verschiedenen Oxidationsstufen des Biopterins durch den Säugetierorganismus können hypothetisch durch spezifisch Tetrahydropterin bindende Transportproteine erklärt werden, die den aktiven Kofaktor vor der Filtration in der Niere und vor Oxidation schützen, die teilreduzierte (IV) und oxidierte Form (III) aber nicht. Zur Klärung dieser wichtigen klinischen Probleme wurden Pterin-Protein-Bindungsstudien an Humanblut und -serum durchgeführt (47).

3.4.1.1. Bindungseigenschaften des Gesamtserums

Humanserum besitzt eine außerordentlich hohe Kapazität, Pteridine an Proteine zu binden, so daß selbst wenig unterhalb der Löslichkeitsgrenze der Pteridine keine Sättigung der Bindungsstellen erreicht wird (Abb. 11). DMPH_4 (XVIII) und BH_4 (V)

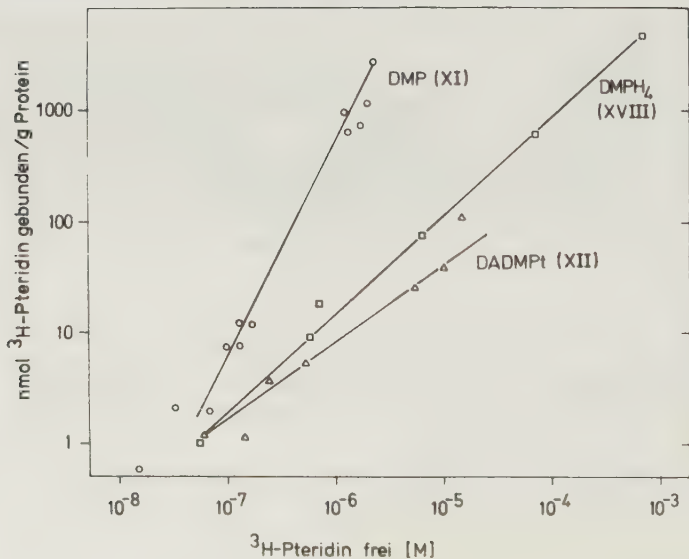


Abb. 11: Gleichgewichtsdialyse von Humanserum und Bindung verschiedener Pteridine (XI, XII, XVIII) an Proteine.

○: DMP (XI), □ DMPH_4 (XVIII), △ DADMPt (XII)

unterscheiden sich nicht in der Steigung ihrer Adsorptionsisotherme. DMP (XI) und DADMPT (XII) werden zwar, verglichen mit DMPH_4 (XVIII), unterschiedlich stark gebunden, doch läßt sich auch hier im betrachteten Konzentrationsbereich (10^{-8} - 10^{-4} M) keine Sättigung erzielen.

Durch Vorinkubation mit "kalten" Pterinen ließen sich die Bindungsstellen nicht absättigen, wie die Ergebnisse der in Abbildung 12 dargestellten Wettbewerbsversuche zeigen.

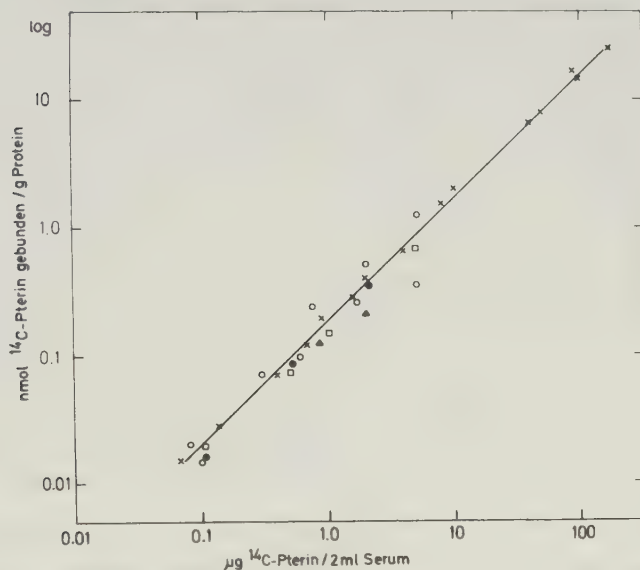


Abb. 12: Wettbewerbsversuche mit Pteridinen in Humanserum. 2 ml dialysiertes Serum wurden mit Pteridinen in verschiedenem Verhältnis inkubiert. Ihre Bindung an Serumproteine wurde mit der "Sephadex"-Methode gemessen. Für Einzelheiten vgl. exp. Teil. o: 2^{14}C-BH_4 ; x: 2^{14}C-DMPH_4 ; ▲: BH_4 - 2^{14}C-DMPH_4 , 200:1; □: BH_4 - 2^{14}C-DMPH_4 , 20:1; ●: DMPH_4 - 2^{14}C-DMPH_4 , 10:1.

Verfolgt man den Verlauf der Bindung von DMPH_4 (XVIII, Abb. 11) mittels der Gleichgewichtsdialyse hin zu niedrigeren Konzentrationen, findet man einen Hinweis auf die Existenz von Proteinen höherer Spezifität gegenüber dem reduzierten Pterin. Aus dem zweiphasigen Verlauf der Bindungskurve (Abb. 13) extrapoliert man eine Sättigungskonzentration von 8 nM und eine Bindungskapazität von 0,3 nmol DMPH_4 /g Protein für diese Proteine.

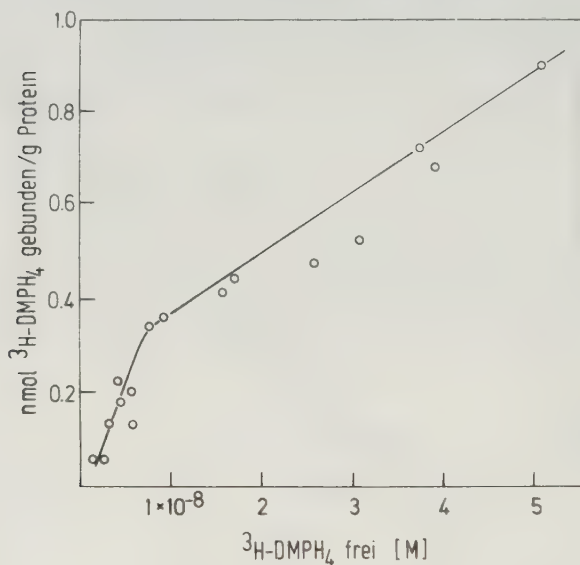


Abb. 13: Gleichgewichtsdialyse zum Nachweis einer spezifischen Bindung von $^3\text{H-DMPH}_4$ (XVIII) an Humanserumproteine (Proteinkonzentration 74-82 mg/ml)

3.4.1.2. Anreicherungsversuche pterinbindender Proteine

Durch den Verlauf der Bindungskurve erscheint die Existenz spezifischer Trägerproteine für Pteridine möglich. Diese mußten aber neben einer überwiegenden Menge adsorptiv bindender Proteine mit hoher Kapazität und nur geringer Affinität vorliegen. Es wurden deshalb verschiedene Methoden versucht, um eine Anreicherung der spezifisch bindenden Proteine zu erzielen.

a) Ionenaustauschchromatographie

Durch Fraktionierung von Humanserum nach Inkubation mit $2\text{-}^{14}\text{C-DMPH}_4$ auf DEAE-Cellulose oder DEAE-Sephadex mit linearem pH- oder Kochsalzgradienten wurden radioaktiv markierte Proteinfraktionen gewonnen (Abb. 14). Rechromatographie dieser angereicherten Fraktionen führte zum Verlust der Bindungsfähigkeit. Fällung mit TCE befreite die Radioaktivität vollständig aus der Proteinbindung.

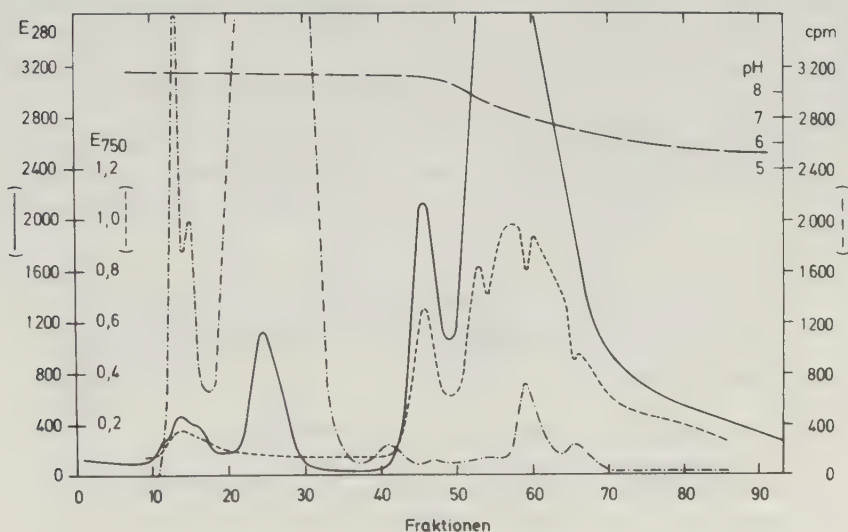


Abb. 14: Fraktionierung von Humanserum auf DEAE-Cellulose. 1, 15 mg $2\text{-}^{14}\text{C-DMPH}_4$ und 20 ml Serum wurden mit Standardpuffer über eine DEAE-Cellulosesäule (2,5 x 33 cm) eluiert und in 10 ml Fraktionen aufgefangen.

b) Gelfiltration über Sephadex G200

Humanserum wurde über Sephadex G200 in drei Fraktionen getrennt, deren Bindungskapazität mit Hilfe der Sephadexmethode (61) oder der Gleichgewichtsdialyse untersucht wurde. Die Art

der Proteine wurde durch vergleichende Disc-Elektrophorese bestimmt (62). Die Fraktion A der Gelfiltration (Abb. 15) bindet DMPH_4 etwa dreimal besser als die Fraktionen B und C und enthält vor allem α_2 -Makroglobuline.

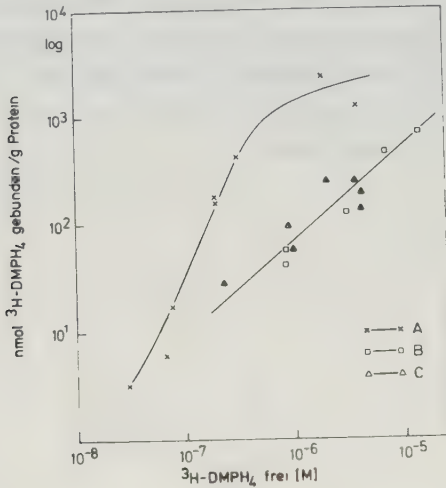


Abb. 15: Gleichgewichtsdialyse der Fraktionen A-C (Sephadex G 200) Proteinkonzentration 4-7 mg/ml

c) Fraktionierung durch Ammoniumsulfatfällung

Durch fraktionierte Fällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ließen sich bei 50 % Sättigung 2^{14}C-DMPH_4 bindende Proteine ausfällen, deren spezifische Bindung allerdings gegenüber dem Gesamtserum nur wenig erhöht war (Fraktion III in Abb. 16).

d) Affinitätschromatographie

Humanserum wurde über DMPH_4 -Agarose filtriert und das angereicherte Protein durch Disc-Elektrophorese charakterisiert. Die Bindungskapazität der pteridinbindenden Fraktion war etwa zehnmal größer als die des Gesamtserums. Eine weitere Anreicherung konnte nicht erzielt werden.

3.4.1.3. Eigenschaften der Pteridin-Protein-Wechselwirkung

Die Bindung von DMPH_4 an Humanserumproteine ist bei 4°C etwa dreimal so hoch wie bei Raumtemperatur. Längere Aufbewahrung bei -20°C sowie Einfrieren und Wiederauftauen hatten auf die adsorptive Bindung kaum Einfluß ebensowenig wie die Erhöhung der Salzkonzentration (Bereich: 0,1-2,0 M NaCl) und des pH (Bereich: 5,5-8,5). DMPH_4 wird im Serum nicht metabolisiert, wenn es vor Sauerstoff geschützt wird. Dialyse entfernt Biopterin (Crithidiaaktivität) bis unter die Nachweisgrenze aus Humanserum ($< 10^{-11} \text{M}$).

Vergleichende Disc-Elektrophorese

Allen angereicherten Pterin bindenden Proteinfractionen gemeinsam ist die Bande der α_2 -Makroglobuline, deren Bindungskapazität aber bei weiteren Reinigungsversuchen verlorengeht.

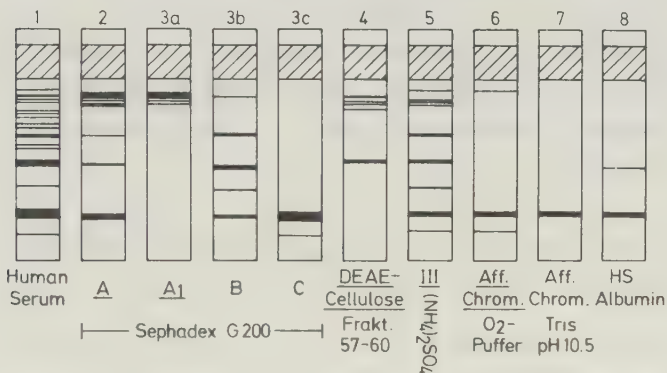


Abb. 16: Vergleichende Disc-Elektrophorese von Humanserum vor und nach verschiedener Auftrennung. Fraktionen, die Pteridin bindende Proteine enthalten, sind unterstrichen.

Proteineinfluß auf das UV-Spektrum von DMPH_4

Das UV-Spektrum des DMPH_4 wird durch die adsorptive Bindung an Serumproteine charakteristisch beeinflusst. Das Absorptionsmaximum bei 300 nm wird durch steigende Proteinkonzentrationen bathochrom verschoben. Zwischen der Konzentration der Bindungsstellen und λ_{max} existiert eine lineare Beziehung (Abb. 17).

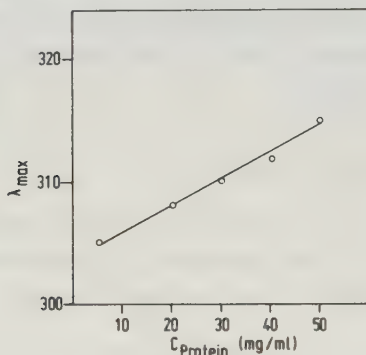


Abb. 17: Einfluß der Proteinkonzentration auf die Lage des Absorptionsmaximums von DMPH_4 in Standardpuffer (pH 8,0) bei verschiedenen Proteinkonzentrationen. Die DMPH_4 -Konzentration betrug 10^{-4} M .

Hemmung der Autoxidation von DMPH_4 durch Bindung an Human- α -Globuline

Die Kinetik der Autoxidation von DMPH_4 -Lösungen (0,2 mM) wurde an Hand ihrer UV-Spektren verfolgt. In Anwesenheit von Human- α -Globulinen (2 mg/ml) ist die Autoxidation durch Luft-sauerstoff deutlich verlangsamt (0,03 $\mu\text{mol/min}$), während im proteinfreien Standardpuffer (Kontrollversuch) eine Anfangsgeschwindigkeit von 0,07 $\mu\text{mol/min}$ gemessen wurde. Dieser Berechnung wurde die Annahme zugrunde gelegt, daß die initiale Reaktion von I. Ordnung ist.

3.4.1.4. Funktion der Erythrocyten im Kofaktortransport

Nach den Ergebnissen der Autoradiographie inkorporieren die Blutgefäße und die Milz keine Radioaktivität nach Injektion von 2^{14}BH_4 (Abb. 10). Da aber in den Erythrocyten eine relativ hohe Biopterinkonzentration (Tab. 10, S. 42) und hohe Aktivitäten der Sepiapterinreduktase, eines Enzyms im Biopterinstoffwechsel (78), gefunden werden, sollte auch die Rolle der roten Blutkörperchen im Transport und in der Verteilung des Biopterins untersucht werden. Der Einbau von 2^{14}C-BH_4 und die Bindung von 3H-DMPH_4 sind für die Erythrocyten eher gering (Tab. 15 b, S. 63). In den Erythrocyten kompartmentiertes Biopterin (Crithidiaaktivität) wird nur langsam ins Plasma abgegeben (Abb. 18). Damit kommt dem hohen Biopterinspiegel in den roten Blutkörperchen eher eine funktionelle Bedeutung und weniger eine Rolle im Transport des Kofaktors zu den Zielorganen zu.

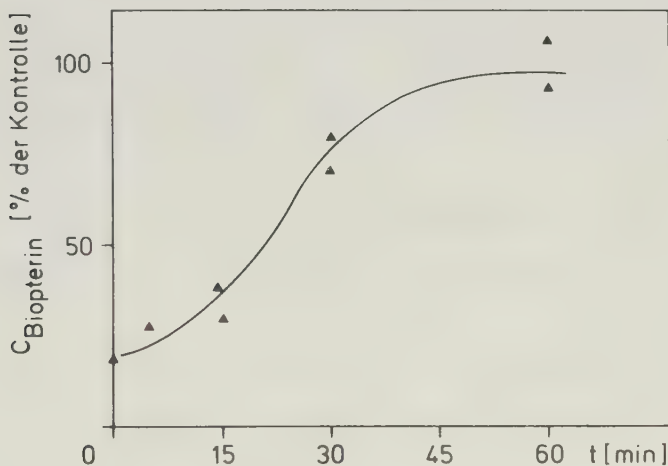


Abb. 18: Biopterinkonzentration (% zum Gehalt im nicht dialysierten Plasma) nach Inkubation frischer Erythrocyten im dialysierten Plasma. Es wurde ein Hämatokrit von 50 angenommen.

Tabelle 12: Subzelluläre Verteilung von Biopterin (Crithidiaaktivität), 2^{14}C -Biopterin und Leitenzymaktivitäten in Leber, Niere und Gehirn der Ratte.

Gewebefraktionen (prozentuale Verteilung $\pm$ SD)											R (%)	Zahl der Experimente
Leber	N	M	L	P	S							
Protein	19,6	2,7	14,9	2,9	14,1	3,5	14,9	2,5	37,2	3,5	97,9	12
Cytochrom-c-ox	15,6	1,4	44,9	5,7	12,3	2,6	2,1	0,4	0		87,5	6
APH	18,7	4,9	5,1	0,8	23,9	8,1	12,1	1,4	19,7	3,1	79,5	6
IDP	18,9		2,8		9,2		42,8		7,3		81	1
LDH	10,4	0,5	2,9	0,7	7,2	0,5	20,3	1,6	68,1	5,8	103,1	6
Biopterin	18,2	7,2	1,6	0,6	8,2	2,7	6,1	3,1	61,3	6,7	82,9	6
2^{14}C -Biopterin	10,9		0,4		0,2		5,1		72,9		89,5	1
Niere												
Protein	16,0	2,8	14,2	2,6	12,8	2,0	15,2	3,6	27,4	2,9	94,8	12
Cytochrom-c-ox	31,9	5,3	39,2	6,2	15,2	7,1	2,65	0,4	0		88,0	6
APH	16,6	1,4	7,0	0,8	18,6	0,6	13,9	1,2	28,3	1,3	78,6	6
IDP	26,3		8,1		9,1		41,6		15,5		100,6	1
LDH	4,4	0,5	1,4	0,7	4,4	1,6	3,5	1,6	77,1	9,2	95,7	6
Biopterin	9,2	3,7	0,9	0,6	8,3	1,5	7,6	0,5	89,1	14	94,0	6
2^{14}C -Biopterin	6,9		0,3		0,2		2,5		76,4		86,4	1
Gehirn												
Protein	15,9	3,1	14,7	1,6	24,5	6,5	14,0	6,5	20,4	1,2	96,7	12
Cytochrom-c-ox	5,5	0,5	66,7	7,1	16,7	1,1	0,2		0		89,1	6
APH	9,5	3,1	4,0	1,8	30,4	4,7	23,3	5,3	22,6	1,2	93,2	6
IDP	18,7		8,9		13,2		39,6		16,1		96,5	1
LDH	2,2	0,9	1,8	0,5	1,5	0,7	2,6	0,3	82,4	8,1	88,9	6
Biopterin	9,4	1,8	2,9	1,2	23,4	3,3	24,9	5,2	26,0	1,2	84,4	6
2^{14}C -Biopterin	5,7		3,2		0,3		4,3		76,4		91,4	1

3.4.2. Intrazelluläre Verteilung von Biopterin

3.4.2.1. Subzelluläre Kompartimentierung

Voraussetzung für das Verständnis biochemischer und physiologischer Funktionen auf zellulärer Ebene ist die Kenntnis der subzellulären Verteilung des Kofaktors. Die Ergebnisse aus der Gewebefraktionierung von Leber, Niere und Gehirn der Ratte sind in der Tabelle 12 aufgeführt. Tabelle 12 und Abbildung 19 fassen die Ergebnisse aus den Studien zur subzellulären Verteilung von Biopterin (Crithidiaaktivität) und 2^{14}C -Biopterin zusammen.

Biopterin und 2^{14}C -Biopterin erscheinen in allen drei betrachteten Organen hauptsächlich im Cytosol angereichert oder werden durch Waschen aus den Fraktionen herausgelöst. Ihre Verteilung folgt der des Leitenzyms Lactatdehydrogenase (LDH). Die Zellkernfraktionen (N) enthalten etwas höhere spezifische Aktivitäten (RSA_N), was auf ihrem hohen Gehalt an nicht aufgebrochenen Zellen beruhen dürfte. Die Fraktion der Mitochondrien (M) enthält im Einklang mit früheren Befunden von Rembold und Metzger (110) die geringste Biopterinmenge kompartimentiert. Die molaren Konzentrationen von Mitochondrien und Cytosol wurden in der Rattenleber in der von Rembold und Buff (25) angegebenen Weise zu $0,25 \mu\text{M}$ (M) bzw. $1,5 \mu\text{M}$ (S) abgeschätzt.

Gegenüber Leber und Niere nimmt das Gehirn eine gewisse Sonderstellung ein: Zwar beobachtet man auch hier eine Anreicherung des Biopterins im Cytosol, aber auch die lysosomale (L) und mikrosomale (P) Fraktion enthalten beträchtliche Mengen

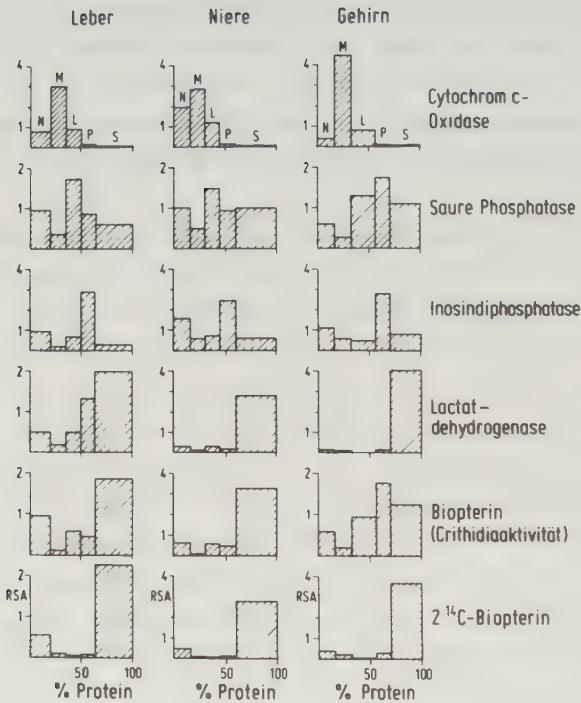


Abb. 19: Relative spezifische Aktivitäten (RSA_x) von Leit-
enzymaktivitäten und Bioterin in subzellulären Fraktionen
von Leber, Niere und Gehirn der Ratte. Experimentelle Ein-
zelheiten und die Bedeutung der Symbole sind im Text angege-
ben.

Crithidiaaktivität. Zur Kontrolle vor der Fraktionierung zugesetztes 2^{14}C -Biopterin (Endkonzentration $0,5 \mu\text{M}$) wird dagegen zur Hauptsache im Cytosol gefunden. Dieser Unterschied ist vermutlich auf den hohen Gehalt dieser Fraktionen an Synaptosomen zurückzuführen. Sie sind keine subzellulären Fraktionen im eigentlichen Sinne, sondern stellen abgescherte Nervenendigungen dar, die, umgeben von der intakten Plasmamembran, Cytosol, Mitochondrien und weitere Zellorganellen einschließen (68).

Aus diesem Grunde wurde die rohe mitochondriale Fraktion des Gesamthirnhomogenats (M, L) weiter über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten zentrifugiert. Die mikrobiologische Bestimmung zeigt Biopterin auf die cytosolische, Myelin-, synaptosomale und mitochondriale Fraktion verteilt (Abb. 20).

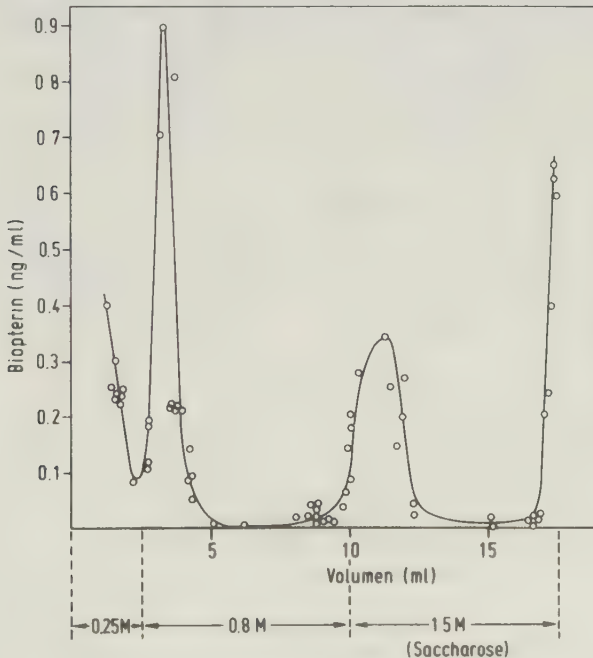


Abb. 20: Dichtegradientenzentrifugation (68) der rohen mitochondrialen Fraktion des Gesamthirnhomogenats: Verteilung der Crithidiaaktivität. 14 Rattengehirne wurden getrennt zentrifugiert und aufgearbeitet.

Inkubiert man dagegen die rohe mitochondriale Fraktion aus Gesamthirnhomogenat vor der Dichtegradientenzentrifugation mit 2^{14}C-BH_4 , findet man nur 3,3 % der Radioaktivität in der partikulären Fraktion (Synaptosomen, Mitochondrien). Die lösliche Fraktion enthält dagegen 82 % der Radioaktivität. Ein ähnliches Ergebnis erhält man mit der rohen mitochondrialen Fraktion aus Leber und Niere (Tab. 13).

Tab. 13: Verteilung von 2^{14}C-BH_4 (c: 0,1 μM) zwischen löslicher und partikulärer Fraktion der rohen mitochondrialen Fraktion von Leber, Niere und Gehirn nach 20 minütiger Inkubation bei 25 ° C.

Organ	lösliche Fraktion (%)	partikuläre Fraktion (%)
Leber	83	2,1
Niere	80	1,7
Gehirn	82	3,3

3.4.2.2. Auswasch- und Bindungsversuche

2^{14}C-BH_4 läßt sich aus den Gewebefractionen quantitativ durch mehrfaches Waschen entfernen, während die Crithidiaaktivität zu einem geringen Prozentsatz (Tab. 14) fest gebunden wird.

Tab. 14: Auswaschversuche

Subzelluläre Fraktionen (N, M, L, P) der Rattenleber wurden dreimal mit 0,3 ml Isolierungspuffer/mg Protein gewaschen

Gewebefraktion		$\frac{\% \text{ Biopterin (gebunden)}}{\text{Crithidiaaktivität}}$	
			2^{14}C
Zellkerne	N	11,8	5,7
Mitochondrien	M	0,9	0,3
Lysosomen	L	7,3	1,2
Mikrosomen	P	20,2	0,0

Beschallt man Zellkerne, Mitochondrien und Lysosomen 1 Minute lang mit 40 - 50 Watt, inkubiert (Branson Sonifier) dann 20 Minuten bei 25 ° C mit 2^{14}C-BH_4 (1 μM) und fraktioniert schließlich über einen kontinuierlichen Dichtegradienten (0,25-1,5 M Saccharose), findet man, daß BH_4 -bindende Proteine durch dieses Verfahren freigesetzt werden. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei den Mitochondrien (Abb. 21). Es könnte sich sowohl um Matrixproteine, als auch um Bestandteile der inneren Membran handeln.

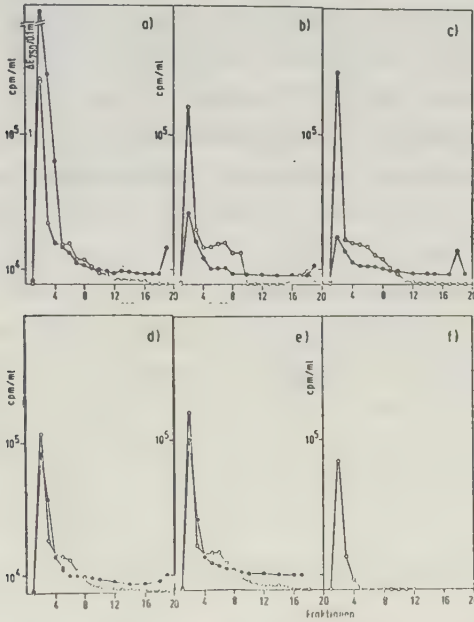


Abb. 21: Bindung von 2^{14}C-BH_4 an subzelluläre Fraktionen der Leber. N, M, L-Fraktionen wurden 1 Minute lang mit 40-50 Watt beschallt. Die Fraktionen wurden in einem kontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten (0,25-1,5 M) aufgetrennt.
 o : 2^{14}C-BH_4 (cpm/ml), • : $\text{C}_{\text{Protein}}$ (Lowry)
 a: Zellkerne (N), b: Mitochondrien (M), c : Lysosomen (L), d: Mikrosomen (P), e : Cytosol (S), f: Kontrolle (o. Protein)

3.4.2.3. Bindung von Tetrahydrobiopterin an Mitochondrien
Da Biopterin nach den vorliegenden Befunden möglicherweise an Proteine im Inneren der Mitochondrien gebunden wird und nach den Untersuchungen von Rembold und Buff (25, 26) eine physiologische Funktion der reduzierten Pterine im mitochondrialen Elektronentransport vorzuliegen scheint, sollten die folgenden Experimente die Frage nach der Spezifität der Bindung beantworten.

Der zeitliche Verlauf der Bindung (Abb. 22) ist in der mitochondrialen Fraktion biphasig, während die Kernfraktion die maximale Radioaktivität schon während der experimentellen Totzeit (3 Minuten) gebunden hat. Das Waschen (vgl. exp. Teil) löst allerdings in beiden Fällen 2^{14}C-BH_4 bis auf eine definierte Restaktivität wieder heraus. Die maximale Bindung dieser Restaktivität ist ebenfalls bereits in der experimentellen Totzeit erreicht. Die Bindung von 2^{14}BH_4 nimmt linear mit steigender Proteinkonzentration zu (Abb. 23).

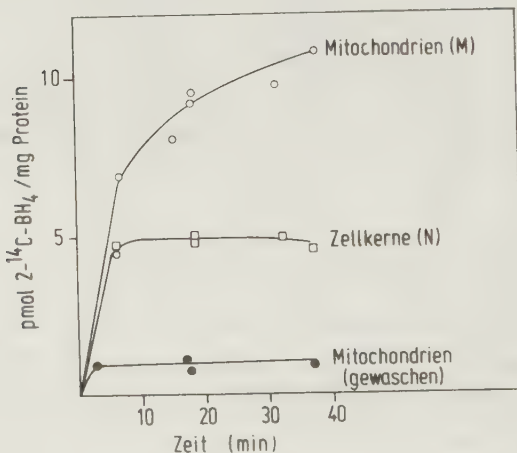


Abb. 22: Bindungskinetik von 2^{14}C-BH_4 ($c: 0,83 \mu\text{M}$) an Mitochondrien und Zellkerne der Rattenleber

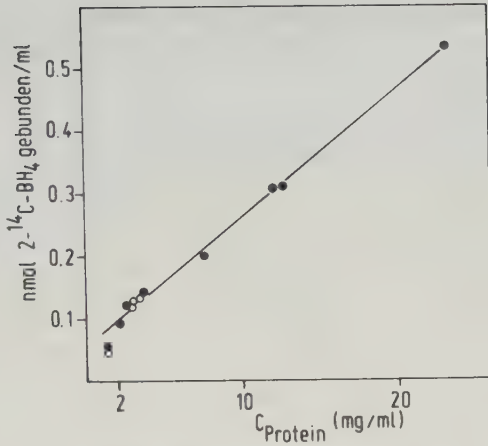


Abb. 23: Abhängigkeit der Bindung von $2\text{-}^{14}\text{C-BH}_4$ an Mitochondrien und Zellkerne von der partikulären Proteinkonzentration ($c_{\text{BH}_4} : 0,83 \mu\text{M}$)

Innerhalb des betrachteten Konzentrationsbereiches ist die Bindung ($\text{pmol BH}_4/\text{mg Protein}$) der Konzentration an freiem $2\text{-}^{14}\text{C-BH}_4$ linear proportional (Abb. 24). Die Auftragung in einem Lineweaver-Burk-Diagramm ergibt eine Gerade mit Verlauf durch den Ursprung und deutet somit auf eine unspezifische Adsorption. Die Bindung ist nicht signifikant verschieden bei 4° , 25° und 37°C .

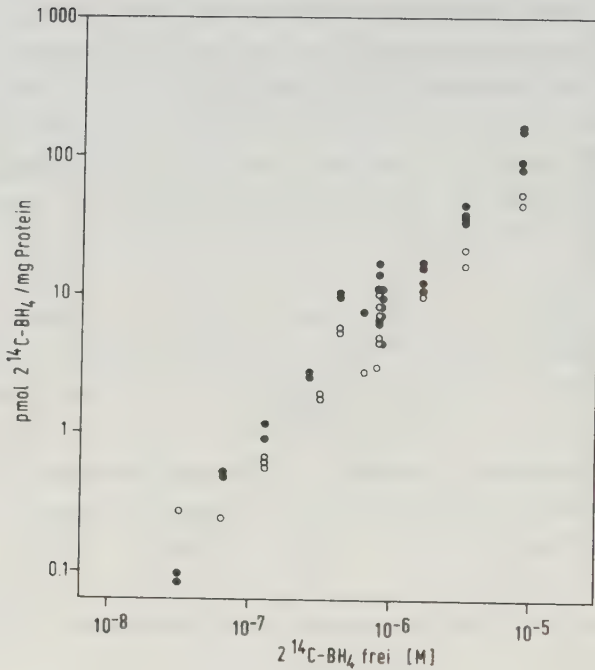


Abb. 24: Bindung von 2^{14}C-BH_4 an Zellkerne und Mitochondrien der Rattenleber (Proteinkonzentration: 2mg/ml)

Einen Vergleich der spezifischen Bindung von 2^{14}C-BH_4 an verschiedene subzelluläre Fraktionen der Leber und der Niere sowie an Erythrocyten zeigt die Tabelle 15. Erythrocyten binden den Kofaktor wesentlich schlechter als die übrigen Zellorganellen.

Tab. 15: Bindung von 2^{14}C-BH_4 an verschiedene subzelluläre Fraktionen der Ratte (c: 0,45 μM)

	BH ₄ -Bindung (pmol/mg Protein)	Proteinkonzentration (mg/ml)
<u>Leber</u>		
Zellkerne	5,1	15
Mitochondrien	9,2	4,8
Lysosomen	10	4,7
<u>Niere</u>		
Zellkerne	8,1	8,5
Mitochondrien	7,5	4,4
Lysosomen	12,9	3,2
<u>Erythrocyten</u>	1,1	11,5

3.4.3. Die Niere als Biopterin bilanzierendes Organ

Neben zellulären Mechanismen und Transportproteinen im Blut können auch die Organe als Ganzes an der Bilanzierung des Kofaktors beteiligt sein. Die Niere ist wohl eines der wichtigsten Organe für die Konservierung von Kofaktoren und niedermolekularen Substanzen. Sie wurde deshalb in Zusammenarbeit mit Dr. D. Häberle (Physiolog.Inst.d.Univ., München) hinsichtlich der Biopterinbilanzierung untersucht.

3.4.3.1. Mikropunktionsstudien

Mikropunktions-, -perfusions- und -infusionstechniken an der Rattenniere in vivo zeigen, daß 2^{14}C-Biopterin und 2^{14}C-BH_4 nicht, die strukturanalogen Pterine $^3\text{H-DMP}$ (XI) und $^3\text{H-DMPH}_4$ (XVIII) nur zu einem geringen Prozentsatz im Nephron resorbiert werden, während das Diureticum DADMPt (XII) wegen seiner höheren Lipoidlöslichkeit und zelltoxischer Effekte isotrop trans-

portiert wird (79). Damit wird der im Plasmawasser frei gelöste Kofaktor filtriert und wegen mangelnder Resorption ausgeschieden.

3.4.3.2. Clearancestudien zur Ausscheidung crithidiaaktiver Substanzen

Die Ratte und auch der Mensch scheiden etwa doppelt so viel crithidiaaktive Substanzen im Harn aus als sie in der Niere filtrieren. Diese Mehrausscheidung ist als sekretorische Leistung der Niere aufzufassen. Die arteriovenösen Differenzen der Crithidiaaktivität sind von Null nicht signifikant verschieden, so daß auch eine Sekretion crithidiaaktiver Substanzen in die Blutbahn angenommen werden muß (Tab. 16). Die hohe Biosyntheserate von Biopterin aus GTP konnten Shiota et al. (81) mit Homogenaten und Zellkulturen der Hamsterniere nachweisen.

Tab. 16: Biopterinkonzentrationen (Crithidiaaktivität) im Plasma der Nierenarterie und -vene und im Harn der Ratte. n = Zahl der Experimente.

	Konzentration	SD	n
Nierenarterie	(ng/ml) 24,9	6,6	7
Nierenvene	(ng/ml) 27,0	5,9	7
Harn	(µg/ml) 2,04	1,06	8

3.5. Biopterin und "atypische" Phenylketonurie

Eigene Befunde lassen als Ursache einer therapieresistenten Phenylketonurie, im folgenden als lethale Hyperphenylalalaninämie (LHPA) bezeichnet, einen molekularen Defekt des Biopterinstoffwechsels vermuten (82). Das Krankheitsbild ist durch eine progressive mentale Retardation beginnend etwa sechs Mo-

Tabelle 17: Verschiedene Formen der Phenylketonurie (PKU)

Nr.	Krankheitsverlauf	beeinflußbar durch Phe-arme Diät	Phenylalanin- Konzentration (mg%)	Phenylalanin- Hydroxylase	DHPR	Pterine Biopterin (B) Tetrahydro- biopterin (BH ₄)	Ref.
1	Oligophrenie, Krämpfe, Ekzeme, abnorme Sehnenre- flexe	+	50	-	+		42
2	Hyperphenylalanin- ämie (ohne Symp- tome der PKU)	+	50	niedrig	+		80
3	Mentale Retardie- rung, schwere Tetraspasmen	-	46	+	+	B (Serum) erniedrigt	40
4	Neurologische Stö- rungen, psychomo- torische Regression	-		20 %	1%	BH ₄ (Leber) erniedrigt	38
5	Myoclonien, Schluck- beschwerden	-	49			B (Serum) erniedrigt	44
6	Cerebrale Degenera- tion, häufige Kram- pe nach 6 Monaten normaler Entwicklung	-	10	+	25%	B (Serum) erhöht	41

nate nach der Geburt gekennzeichnet. Gleichzeitig setzen schwere neurologische Störungen und Anfälligkeit gegenüber Infektionen ein. Die Tabelle 17 gibt eine Übersicht über diesen und einige weitere bekanntgewordene Fälle. Im Fall 6 wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe D. M. Danks (Royal Children's Research Foundation, Parkville, Australien) einige biochemische Parameter näher untersucht. Bei Geburt des Kindes war ein erhöhter Phenylalaninspiegel festgestellt worden und sofort eine sorgfältige diätetische Kontrolle dieser Aminosäure begonnen worden. Die Spiegel der Neurotransmitter Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und Serotonin bzw. ihrer Metabolite Hydroxyvanillinessigsäure und 5-Hydroxyindolessigsäure waren im Plasma und CSF gegenüber Normalwerten erniedrigt. Dagegen fand man den Spiegel crithidiaaktiver Substanzen (Tab. 18) stark erhöht.

Tab. 18: Spiegel crithidiaaktiver Substanzen (Biopterin) in Körperflüssigkeiten des Menschen

Krankheit	Plasma (ng/ml)	CSF (ng/ml)	Harn (µg/ml)
PKU (klassisch)	3,4 4,4 4,8		
LHPA	12,4 $\pm$ 2,7 1,2	0,79 0,73*	1,6 $\pm$ 0,4
Kontrolle (G. H.)	2,2		
Ref. 72	0,9 $\pm$ 0,2	0,4	2,1 $\pm$ 0,3
73	2,6		
74	1,8 $\pm$ 0,06	1,9	2,1 $\pm$ 0,19

* 4 Stunden nach Injektion von BH₄ (2 mg/kg Körpergewicht)

Die Crithidiaaktivität im Harn des Patienten und einer gesunden Kontrollperson läßt sich durch Hochspannungselektrophorese in

zwei Komponenten auftrennen. Es handelt sich vermutlich um Biopterin ($R_Q:0,4$) und Tetrahydrobiopterin ($R_Q:0,75$). Der Patient mit LHPA scheidet etwa 6 -10fach höhere Konzentrationen crithidiaaktiver Substanzen aus (Abb. 25) und einen Metaboliten ($R_Q:0,12$), der nach Befunden von B. M. Watson et al. (83) als Dihydroxanthopterin charakterisiert wurde. Dihydroxanthopterin (7,8-Dihydro-6-hydroxypterin) wurde von Rembold et al. (84) als Katabolit des Tetrahydrobiopterins erkannt. Der Patient synthetisiert offensichtlich den Pterinkofaktor der mischfunktionellen Oxygenasen in erhöhtem Maße, ohne ihn ausreichend für die Produktion der Neurotransmitter einsetzen zu können. Nach Befunden von Danks et al. (41) könnte der molekulare Defekt dieser Erbkrankheit in der mangelnden Regenerierung des aktiven Kofaktors liegen. Diese Frage ist noch nicht endgültig geklärt.

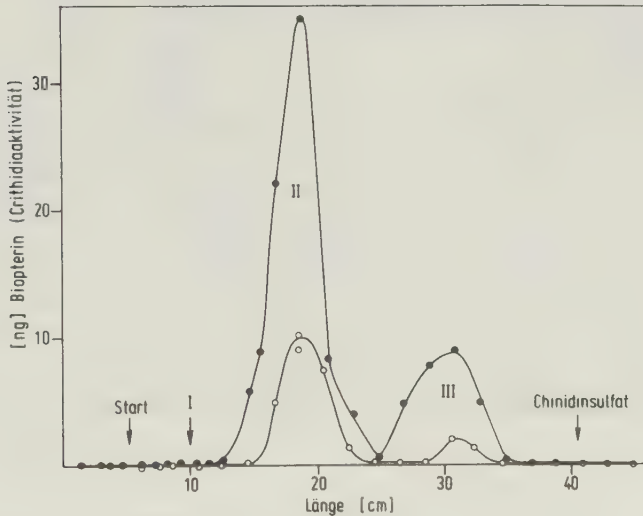


Abb. 25: Crithidiaaktivitätsmuster (Biopterin) im Menschenharn nach Hochspannungselektrophorese. Je 0,3 ml Normalharn (o-o) und LHPA-Harn (●-●) wurden aufgetragen und ihre Wanderung mit Chinidinsulfat (R_Q) verglichen.

Obwohl der Plasmaspiegel crithidiaaktiver Substanzen sehr hoch war, führte die intravenöse Zufuhr von BH_4 (2 mg/kg) zu einem drastischen Abfall der Phenylalaninspiegel und zum Anstieg der Neurotransmitter und ihrer Metabolite (Abb. 26, 27). Kurz nach dem Abfall des Phenylalaninspiegels stieg der Biopterinspiegel im Harn an, was auf den Verbrauch des Kofaktors in der enzymatischen Reaktion deutet. Damit wurde gezeigt, daß Tetrahydrobiopterin den intrazellulären Wirkort erreicht hat und schließlich renal eliminiert wurde.

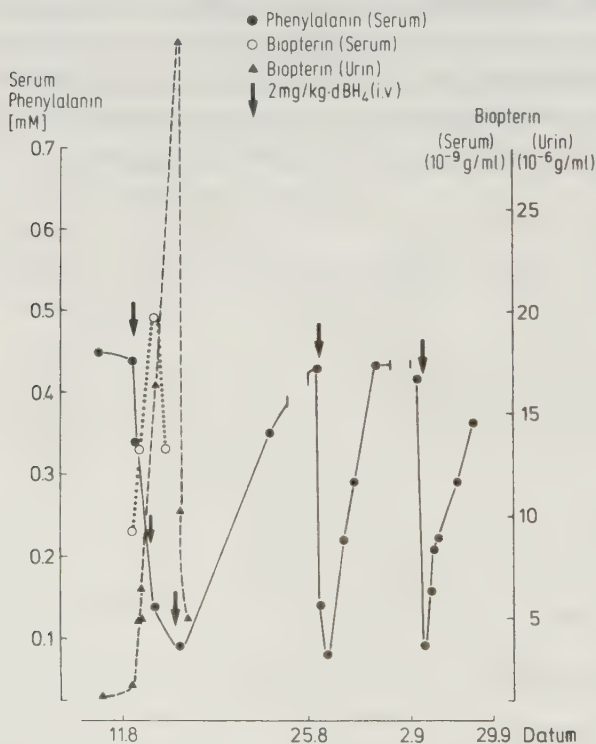


Abb. 26: Einfluß der i.v.-Injektion von BH_4 (2 mg/kg Körpergewicht) auf den Phenylalanin- und Biopterinspiegel in Plasma und Urin bei letaler Hyperphenylalaninämie (LHPA).

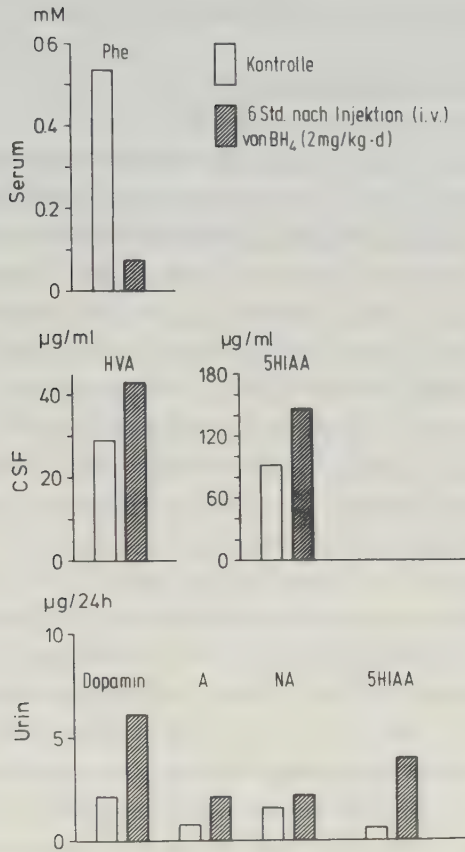


Abb. 27: Einfluß der i. v. -Injektion von BH_4 (2 mg/kg) auf Metabolite der Katecholamine und des Serotonins in Harn und CSF

4. DISKUSSION

4.1. Isotopenmarkierte Pteridine

Pteridine sind im Säugetierorganismus in sehr niedrigen Konzentrationen von 10^{-9} - 10^{-6} M enthalten. Für diesen Konzentrationsbereich stehen im Augenblick außer dem mikrobiologischen Crithidiatest und Isotopentechniken keine ausgearbeiteten Methoden zur Verfügung, die es gestatten, schnell und zuverlässig Wechselwirkungen mit biologischen Strukturen zu erfassen. Auch die bereits synthetisierten ^{14}C -markierten Pteridine (111) haben mit einer maximal erreichbaren spezifischen Radioaktivität von 50 mCi/mmol pro eingebautes Kohlenstoffisotop nur begrenzte Anwendungsmöglichkeiten. Zwei Beispiele aus vorliegenden Arbeiten mögen dies verdeutlichen:

1. Die Erfassung spezifischer Protein-Kofaktor-Wechselwirkungen im Humanserum erfordert die Anwendung von Konzentrationen im Bereich von 10^{-10} - 10^{-8} M, also unterhalb der physiologischen Konzentration. Aus praktischen Gründen stehen Probenvolumina von 0,1 ml zur Bestimmung der Radioaktivität zur Verfügung, die mindestens 150 dpm (5fache Nullrate) enthalten sollen. Bei einer spezifischen Radioaktivität von 50 mCi/mmol ergibt sich eine Grenzkonzentration von 10^{-8} M. Der entscheidende Konzentrationsbereich läßt sich also nur mit einer hundertfach höheren spezifischen Radioaktivität erfassen, die durch Markierung mit ^{14}C nicht erreicht werden kann.

2. Bei Mikropunktionsstudien am intakten Nephron der Ratteniere stehen Probenvolumina von 20 - 200 nl zur Verfügung. Diese müssen etwa 10 dpm/nl enthalten, was bei Verwendung von ^{14}C -Pterinen mit etwa 50 mCi/mmol einer Grenzkonzentration von 10^{-4} M entspricht. Das ist aber schon die tausend-

fache physiologische Pterinkonzentration im Ultrafiltrat.

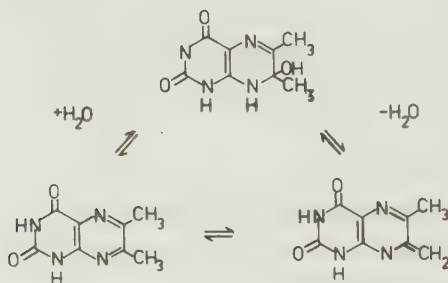
Die Markierung mit Tritium erlaubt im Gegensatz zum ^{14}C -Isotop wesentlich höhere spezifische Radioaktivität mit 29 Ci/mmol für jedes im Molekül enthaltene Tritium. Einer generellen Anwendung von Tritium steht allerdings oft die bei Pterinen hohe Austauschrate der am Pteridinring gebundenen Wasserstoffatome im Wege.

Vor Durchführung der Synthese mit trägerfreiem $^3\text{H}_2$ (Weg XV-XI) wurden die deuterierten und tritiierten Pteridine XI, XII und XVIII durch Hydratisierung von Diacetylen mit anschließender Kondensation zum Pteridin (Weg XIII-XI) hergestellt, um die Stabilität des eingebauten Isotops in den Methylgruppen zu überprüfen. Es zeigte sich, daß Deuterium und Tritium nur zu 61 bzw. 23 % der berechneten Aktivität in der Pteridine eingebaut werden. Als Erklärung für diesen Befund wird ein Isotopeneffekt angenommen, der den Einbau des leichten Wasserstoffisotops gegenüber den anderen bevorzugt. Folgende Gründe sprechen für eine solche Annahme:

1. Da die Isotopenverteilung der deuterierten Pteridine XI, XII und XVIII in den Methylgruppen uneinheitlich ist (d_o-d_6), könnte auch ein HD-Austausch während der Kondensationsreaktion angenommen werden. Kondensiert man aber ^1H -Diacetyl in Deuteriumwasser oder $^3\text{H}_2\text{O}$ mit dem entsprechenden Pyrimidin zum Pteridin, findet man keinen Einbau von Deuterium und keine Radioaktivität in den Methylgruppen. Außerdem erwartet man bei vollständigem HT-Austausch aus ^3H -Diacetyl während der Kondensationsreaktion eine spezifische Radioaktivität von 4,7 Ci/mol. Gefunden wurde ein Wert von 18,1 Ci/mol. Als Grund für die uneinheitliche Isotopenverteilung kann aber auch ein HD- oder HT-Austausch während der Hydratisierungsreaktion

angenommen werden. Dieser Austausch kann aber nicht vollständig ablaufen, da man in diesem Falle eine spezifische Radioaktivität von 77 Ci/mol erwartet. Die Synthese von d_6 -Diacetyl durch säurekatalysierten Austausch mit DCl und "kaltem" Diacetyl ist nach D. S. Herr et al. (88) möglich. Die Reaktionszeiten liegen wegen der geringen Enolisierungstendenz der vicinalen Diketone bei mehreren Wochen. Die Bevorzugung des ^1H -Einbaus in Diacetyl ist auch theoretisch begründbar. Die Aktivierung der D-O bzw. T-O-Bindung im Wasser erfordert eine höhere Energie als die Lockerung der H-O-Bindung. Auf der anderen Seite ist die C-H-Bindung im Diacetyl gegenüber einem Austausch via Keto-Enoltautomerie recht stabil, so daß man aus $^2\text{H}_2\text{O}$ und $^3\text{H}_2\text{O}$ keinen Einbau in die Methylgruppen der Pteridine findet.

2. Der geringe Einbau von ^2H und ^3H in die Pteridine läßt neben der Erklärung durch einen Isotopeneffekt noch die hypothetische Möglichkeit eines HD- oder HT-Austausches der Methylgruppen der Pteridine mit wässrigen Lösungsmitteln zu. Plaut und Mitarbeiter (89, 90) fanden einen derartigen Austausch aus der 7-Methylgruppe des 6,7-Dimethylumazins (2,4-Dihydroxy-6,7-dimethylpteridin) und postulierten den folgenden Reaktionsmechanismus:



Dieser Austausch über eine 7-(exo)-Methylengruppe wurde bei den Pteridinen XI, XII und XVIII nicht gefunden. Sowohl massenspektrometrische und NMR-Befunde mit den deuterierten Verbindungen als auch die Kontrolle der spezifischen Radioaktivität sprechen für eine stabile Markierung in den 6,7-Methylgruppen.

4.2. Tetrahydrobiopterin und die Biosynthese der biogenen Amine

Die Biosynthese der Katecholamine und des Serotonins wird durch die Hydroxylierung von Tyrosin bzw. Tryptophan (15, 16) eingeleitet. Tryptophan-5-Hydroxylase läßt sich aus der Synaptosomenfraktion von Stammhirn-, Nucleus caudatus-, Hypothalamus-, Lumbosakralmark- und Zirbeldrüsenhomogenat (35, 36) isolieren. Die Neurotransmitterfunktion des Serotonins gilt in diesen Bereichen des ZNS als gesichert. Die entsprechenden Neurone sind in die zentrale Regulation der Körpertemperatur, des Schlafes, des Sexualverhaltens und in pathophysiologischer Sicht in die Genese von Psychosen eingeschaltet (91). Die Tyrosinhydroxylase wurde aus den Katecholamin synthetisierenden Geweben Nebennierenmark, den peripheren Nervenendigungen des Sympathicus, dem Hypothalamus und dem Nucleus caudatus isoliert. Die Bedeutung der Katecholamine als Neurotransmitter des Sympathicus und zahlreicher Neuronengruppen des ZNS (Teile des extrapyramidalen Systems, Thalamuskern, Striatum, Hippocampus) wurde von Krnjevic (92) ausführlich dargestellt. Dieser Schritt der Neurotransmitter-Biosynthese wird als geschwindigkeitsbestimmend angesehen, da die Aktivitäten der beiden Enzyme wesentlich geringer als die der nachgeschalteten (DOPA-Decarboxylase, Dopamin- β -hydroxylase, Phenyläthanolamin-N-methyltransferase, 5-Hydroxytryptophandecarboxylase, Monoaminoxidasen) sind (93).

Obwohl Tetrahydrobiopterin als der natürliche Kofaktor dieser Schlüsselenzyme des Katecholamin- und Serotoninstoffwechsels angesehen wird, ist die Kenntnis seines regulativen Einflusses auf die Biosynthese und seiner eigenen Bestandskontrolle noch lückenhaft. Nach Befunden von McGeer und McGeer (94) kommt aber der Kofaktorkonzentration möglicherweise eine Bedeutung

für die langfristige Bereitstellung der Neurotransmitter zu. Die Endprodukte der Katecholaminbiosynthese hemmen in vitro und in vivo die Aktivität der Tyrosinhydroxylase. In vivo soll ihre Aktivität nur 20 % der in vitro gemessenen betragen. Diese Endprodukthemmung aber wird durch einen erhöhten Tetrahydrobiopterinspiegel antagonisiert. Ein Vergleich der Kofaktorspiegel mit den K_m -Werten der Hydroxylasen für den natürlichen Kofaktor läßt die Möglichkeit einer Regulation der Enzymaktivität über die Kofaktorkonzentration zu (Tab. 19).

Tab. 19: Michaelis- und Hemmkonstanten (K_m , K_i) der mischfunktionellen Oxygenasen der Ratte

Organ	Enzym	Substrat	K_m, K_i (M)	Ref.
Gehirn	Tyrosinhydroxylase	DMPH ₄ (XVIII)	$2,5 \times 10^{-4}$	115
		DOPA	$2,5 \times 10^{-5}$	115
		Noradrenalin	$4,6 \times 10^{-5}$	115
		Adrenalin	$4,6 \times 10^{-5}$	115
Synaptosomen	"	Tyrosin	$5,0 \times 10^{-6}$	37
Leber	Phenylalanin	BH ₄ (V)	$4,5 \times 10^{-6}$	116
		DMPH ₄ (XVIII)	$7,0 \times 10^{-5}$	116
		Katecholamine	10^{-5}	117

4.3. Störungen des Biopterinstoffwechsels (LHPA)

Die lebensnotwendige Bedeutung des Tetrahydrobiopterins für die langfristige Bereitstellung der Katecholamine und des Serotonins manifestiert sich in rezessiven Erbkrankheiten vom Typ der Phenylketonurie, der ein gestörter Biopterinstoffwechsel zugrunde liegt (PKU mit "atypischem" Verlauf, Lethale Hyperphenylalaninämie LHPA). Diese Stoffwechselerkrankungen zeigen ein quantitativ und qualitativ verändertes Pteridinmuster im

Serum und Harn. Eine Störung der Tetrahydrobiopterinsynthese oder -regenerierung führt langfristig zu einer Entleerung der funktionellen Neurotransmitterspeicher und gerade in der kritischen Phase der frühen Gehirnentwicklung zu schweren klinischen Manifestationen (82).

Der beschriebene Fall (41) einer schweren, therapieresistenten Form der Phenylketonurie zeigt eine stark gesteigerte Biosynthese crithidiaaktiver Pteridine und von Dihydroxanthopterin (7,8-Dihydro-6-hydroxypterin), einem Kataboliten des Tetrahydrobiopterins (84). Der erhöhten Biosynthese des Kofaktors steht aber eine eingeschränkte Bildung der Katecholamine und des Serotonins gegenüber. Die Aktivität der Dihydropterinreduktase beträgt nur 25 % oder weniger der Normalaktivität (112). Das klinische Bild dieses Patienten ist durch schwere neurologische Störungen gekennzeichnet, die mit der Defizienz der Neurotransmitter in bestimmten funktionellen Bereichen des ZNS korreliert werden können (87). Störungen des Serotoninbestandes im Hypothalamus führen zum Ausfall der Temperaturregulation, die sich in Fieberanfällen ohne erkennbaren äußeren Infekt manifestieren. Antipyretica können den Verlauf dieser zentralen Regulationsstörung nicht beeinflussen (43). Im vorliegenden Fall konnte der Einfluß der Plasmakonzentration des Tetrahydrobiopterinspiegels auf den Phenylalaninspiegel gezeigt werden. Gleichzeitig mit der i. v. Zufuhr des Kofaktors (2 mg/kg Körpergewicht) und dem drastischen Abfall des Serumphenylalaninspiegels steigen die Konzentrationen der Katecholamine, des Serotonins bzw. ihrer Metabolite im Plasma, CSF und Harn an. Tetrahydrobiopterin erreicht seinen intrazellulären Wirkort und senkt den Phenylalaninspiegel durch Hydroxylierung zum Tyrosin. Die intravenöse Zufuhr von BH_4 hat im Falle der klassischen PKU (Hydroxylasemangel) dagegen

keine Wirkung auf den Phenylalaninspiegel. BH_4 wirkt in katalytischen Mengen (2 mg/kg), wird also zumindest teilweise regeneriert. Denn nach Berechnungen von Kaufman et al. (38) wären für diesen Effekt Tagesdosen von 50 - 100 mg/kg Körpergewicht erforderlich, falls der Kofaktor in der Hydroxylierungsreaktion stöchiometrisch umgesetzt und nicht regeneriert würde. Obwohl BH_4 die Blut-Hirnschranke nicht überwindet, steigt die Dopaminkonzentration in der CSF an. Da aber auch die Katecholamine selbst diese Membranbarriere nur schwer durchdringen (95), deutet dieser Befund auf eine gesteigerte Neurotransmitterbiosynthese im Gehirn hin. Die Ursache dieses Effektes könnte der Fortfall der Hemmwirkung hoher Phenylalaninspiegel auf die mischfunktionellen Oxygenasen des Gehirns sein (94). Ob die periphere Zufuhr des aktiven Kofaktors allerdings für genügend hohe Katecholamin- und Serotoninspiegel im ZNS sorgen und damit für therapeutische Zwecke eingesetzt werden kann, bleibt ungeklärt.

Die eingeschränkte DHPR-Aktivität wird im beschriebenen Fall von einer überschießenden Biosynthese von Pterinen begleitet. Das könnte als Hinweis auf eine mögliche regulative Kopplung der Biosynthese des Tetrahydrobiopterins an die Regenerierung oder Exkretion über die intrazelluläre funktionelle Kofaktorkonzentration gesehen werden. So führt bei ausreichendem Kofaktorbestand gesunder Ratten die intraventrikuläre Injektion von BH_4 erst bei unphysiologisch hohen Dosen zu einem geringen Anstieg der Hydroxylierung von Tyrosin zu DOPA in vivo (96).

Trotz der Seltenheit des beschriebenen molekularen Defekts zeigt die Existenz dieser Erbkrankheit die Bedeutung des Tetrahydrobiopterins für die langfristige Bereitstellung der Katecholamine und des Serotonins. Damit erhält die Kontrolle des Kofaktorbestandes auch für andere Krankheitszustände Bedeutung,

denen möglicherweise eine Störung des Katecholamin- und Serotoninstoffwechsels zugrunde liegt (97, 98) (z. B. Parkinsonismus, Schizophrenie).

4.4. Bereitstellung, Bilanzierung und physiologische Funktion des Tetrahydrobiopterins

4.4.1. Biosynthese des Kofaktors

Tetrahydrobiopterin wird im Säuger aus GTP über das Dihydro-neopterintriphosphat als Zwischenstufe synthetisiert. Besonders aktive Quellen sind Homogenate und Zellkulturen der Niere des syrischen Goldhamsters (81). Die Biosynthese führt zum 7,8-Dihydrobiopterin, wobei die wichtige Frage, ob es eine wirkliche Zwischenstufe oder nur das Endprodukt der irreversiblen Umlagerung des chinoiden Dihydrobiopterins ist, noch ungeklärt ist. Es gibt außerdem keinerlei Informationen über die Kontrolle dieser Biosynthese im Säuger, es fällt aber auf, daß bei bestimmten Störungen des Purinstoffwechsels (Gicht, Lesh-Nyhan-Syndrom) der Biopterinspiegel erhöht ist (72, 73). So findet auch Kokolis (27) in Tumoren und regenerierendem Lebergewebe der Ratte zeitliche Zusammenhänge zwischen einem Anstieg des Tetrahydrobiopterinspiegels und der DNA-Synthese.

4.4.2. Stoffwechselfunktion der Tetrahydropterine

Es gibt eine Reihe von Befunden, die für eine allgemeine Stoffwechselfunktion der reduzierten Pterine im Säuger sprechen. So konnten Rembold und Buff (25, 26) sowohl in einem löslichen System als auch mit intakten Mitochondrien eine Beteiligung reduzierter Pterine am mitochondrialen Elektronentransport in vitro demonstrieren. In diesem Zusammenhang war die pharmakologische Wirkung der Pteridindiuretica von besonderem Interesse. Die diuretische Aktivität des Triamterens oder des DADMPt (XII)

könnte auf einer Hemmung wichtiger Stoffwechselreaktionen beruhen, an denen der natürliche Kofaktor beteiligt ist. Diese Arbeitshypothese wurde durch Untersuchungen von Herken (101) zum Wirkungsmechanismus des 6-Aminonicotinamids gestützt. Diese Substanz wirkt ebenfalls als kaliumretinierendes Diureticum, wird aber wegen seiner ausgesprochenen Neurotoxizität nicht klinisch verwendet. Sein molekularer Wirkungsmechanismus läßt sich durch seine Struktur als Antimetabolit des Nicotinamides erklären: 6-Aminonicotinamid wird enzymatisch an Stelle von Nicotinamid in Pyridinnucleotide eingebaut. Diese abnorm strukturierten Pyridinnucleotide übertragen ihren Wasserstoff in enzymatischen Reaktionen nur schlecht, verdrängen aber auf der anderen Seite NADH und NADPH von ihren Bindungsstellen. Die Hemmwirkung ist gegenüber Nicotinamid kompetitiv (100). Triamteren interferiert mit der Wirkung von 6-Aminonicotinamid, indem es die Biosynthese der 6-Aminonicotinamid enthaltenden Pyridinnucleotide hemmt (101). Der pharmakologische Wirkungsmechanismus dieser Diuretica könnte damit möglicherweise auf der Hemmung energieliefernder Prozesse in der Nierenzelle beruhen. Allerdings scheinen die Mitochondrien selbst nicht beeinflußt zu werden, da die Gruppe der Aldosteronantagonisten und der "Pseudoaldosteronantagonisten", zu der die Pteridindiuretica gehören (28, 103), im Gegensatz zu den Benzothiadiazinen und quecksilberhaltigen Diuretica (Chlormerodrin) die mitochondriale Atmung, Phosphorylierung und den Ca-Transport nicht beeinflussen (102). Obwohl DADMPt nach den Befunden der Mikropunktionsexperimente in der Niere resorbiert wird und damit eine intrazelluläre Wirkung entfalten könnte, wird seine pharmakologische Wirkung auf den Natriumtransport aufgrund von Untersuchungen an der Froshhaut (104) durch eine lokale Änderung der Membranpermeabilität erklärt. Die Resorption der Pteridindiuretica scheint für ihre Hauptwirkung nicht verantwortlich zu sein, sondern be-

ruht auf der höheren Lipoidlöslichkeit der 2,4-Diaminopteridine gegenüber den analogen Pterinen (Tab. 20).

Tab. 20: Verteilungskoeffizienten (γ) verschiedener Pteridine. (Obere Phase: Standardpuffer; untere Phase: CHCl_3 ; Temperatur: 37°C).

Pteridin	$c_{\text{Pteridin}} (\text{M})$	$\gamma (c_{\text{unt.}} / c_{\text{oben}})$
DMP (XI)	10^{-3}	0,003
DMPH ₂ ^{*)}	10^{-3}	0,002
DMPH ₄ (XVIII)	10^{-3}	0,006
Biopterin (III)	10^{-3}	0,0006
BH ₄ (V)	10^{-5}	0,0003
DADMPt (XII)	10^{-3}	0,34
	10^{-5}	0,38

*) 7,8-Dihydro-6,7-dimethylpterin

4.4.3. Kompartimentierung von Biopterin und Tetrahydrobiopterin im Säuger

Biopterin (Crithidiaaktivität) und Tetrahydrobiopterin (2^{14}C-BH_4) sind nach den Ergebnissen dieser Arbeit intrazellulär angereichert. Die höheren Konzentrationen in bestimmten Organen (Leber, Niere, Milz, Nebenniere (11), Lunge (11)) und Gehirnsabschnitten (Hypothalamus) sprechen für eine funktionelle Kompartimentierung des Kofaktors. Diese regionale Verteilung korreliert mit der der mischfunktionellen Oxygenasen (105, 106) bzw. der Katecholamine und des Serotonins (65, 107). Die Rolle des Serotonins und der Katecholamine für die zentrale Regulation

physiologischer Funktionen ist in diesen Gehirnabschnitten nachgewiesen worden (91, 92).

4.4.4. Transport und Verteilung des Kofaktors

Aus der unterschiedlichen Verteilung des Biopterins auf verschiedene Organe resultiert auch ein Konzentrationsgradient zwischen intra- und extrazellulären Kompartimenten, der besonders zwischen Leber und Plasma ausgeprägt ist. Injiziert man 2^{14}-BH_4 , wird die Radioaktivität offenbar gegen diesen Gradienten in die Leber transportiert. Spezifische Transportproteine könnten die Verteilung reduzierter Pterine in die funktionellen intrazellulären Kompartimente vermitteln und an der Kofaktorkonservierung und -diskrimination beteiligt sein. Diese Hypothese erscheint nach den Befunden der Bindungsstudien wenig wahrscheinlich. Alle Oxidationsstufen des natürlichen Kofaktors, des analogen Dimethylpterins und des Antimetaboliten DADMPT (XII) werden im betrachteten Konzentrationsbereich (10^{-10} - 10^{-3} M) adsorptiv gebunden. Die Art dieser Bindung kann als "low affinity, high capacity"-Wechselwirkung beschrieben werden. Eine leicht erhöhte Spezifität gegenüber α_2 -Makroglobulinen im unteren Konzentrationsbereich läßt sich auch durch die Spezifität des folsäurebindenden Proteins (FABP) gegenüber der Pteridinstruktur des DMPH₄ (XVIII) erklären. Das FABP wurde ebenfalls als α_2 -Makroglobulin beschrieben (108). Möglicherweise handelt es sich aber auch um Pterine bindende Proteine, die durch Exocytose aus dem intrazellulären Kompartiment ausgeschleust wurden.

Erythrocyten scheinen ebenfalls nicht am Transport des Kofaktors beteiligt zu sein, da sie 2^{14}C-BH_4 nur schwer und wenig spezifisch einbauen und umgekehrt Biopterin aus ihnen nur sehr

langsam freigesetzt wird. Auch in der Autoradiographie sieht man keine Inkorporation der Radioaktivität in die Milz und in Anschnitten der Blutgefäße. Die hohe Crithidiaaktivität der Erythrocyten stellt damit möglicherweise eine funktionelle Kompartimentierung dar, deren physiologische Bedeutung aber unbekannt ist.

4.4.5. Die Rolle der Niere in der Bilanzierung des Kofaktors

Die Biopterinkonzentrationen (Crithidiaaktivität) sind im Plasma der Nierenarterie und -vene nicht signifikant verschieden. Die Autoradiographie zeigt 2^{14}C-BH_4 in der Niere intrazellulär und im Nierenbecken angereichert. Gleichzeitig wird der Kofaktor aber vom Nephron aus nicht resorbiert. Diese Befunde deuten auf anisotrope Transporte des Biopterins in der Niere: Biopterin wird in das Tubuluslumen und möglicherweise in die Blutbahn sezerniert. Im Einklang mit den Befunden von Shiota und Mitarbeitern muß man eine hohe Biosyntheseleistung der Niere annehmen. Diese Stoffwechselleistung der Niere könnte eine wichtige Rolle in der Versorgung des Organismus mit dem Kofaktor spielen, aber auch auf einer Verknüpfung mit dem Purinstoffwechsel beruhen, der in der Niere besonders aktiv ist.

4.4.6. Die Rolle exogenen Biopterins (Nahrungsaufnahme)

Fütterungsversuche mit biopterinfreier Diät zeigten, daß Biopterin kein Vitamin ist (113, 114), sondern endogen in ausreichender Menge synthetisiert wird. Es wird allerdings auch mit der Nahrung aufgenommen und im Magen-Darmtrakt resorbiert und kann im Organismus gespeichert werden (110). Tetrahydrobiopterin wird wegen seiner Oxidationsempfindlichkeit normalerweise nicht in nennenswerten Mengen in der Nahrung vorkommen

und kann nach Blair et al. (109) die Membranbarrieren des Gastrointestinaltrakts auch nicht überwinden. Oral verabreichtes Biopterin dagegen erhöht in kurzer Zeit den Plasmaspiegel crithidiaaktiver Substanzen. Im Falle der LHPA führt dieser Anstieg der Biopterinkonzentration aber nicht zu einer Veränderung des Phenylalaninspiegels und des Phe/Tyr-Verhältnisses. Ob der Säuger in der Lage ist, oxidiertes Biopterin zum enzymatisch aktiven Kofaktor zu regenerieren, bleibt damit offen. Die Demonstration einer Biopterinreduktase ist jedenfalls bisher nicht gelungen.

Auch das 7,8-Dihydrobiopterin kann zwar in vitro von der Dihydrofolatreduktase regeneriert werden, doch scheint dieser Weg in vivo für den Biopterinstoffwechsel keine Bedeutung zu haben. Trimethoprim (2,4-Diamino-5-(3', 4', 5'-trimethoxybenzyl)pyrimidin), ein spezifischer Hemmstoff der bakteriellen Dihydrofolatreduktase, hat auf den Stoffwechsel des Biopterins in der Rattenleber offensichtlich keinen Einfluß (99).

Die Radioaktivität im Magen-Darmtrakt der Ratte nach Injektion von 2^{14}C-BH_4 (Autoradiographie) läßt sich hypothetisch durch Annahme eines spezifischen Einbaus des aktiven Kofaktors gegen einen Konzentrationsgradienten in die Leber und den Abfluß des teilreduzierten Biopterins über den Gallengang erklären. Rembold und Metzger (110) fanden allerdings keine Radioaktivität nach i.p. Injektion von 2^{14}C-BH_4 und 2^{14}C-Biopterin in den Faeces. Dieser scheinbare Widerspruch läßt sich durch die Resorption des Biopterins und 7,8-BH₂ im Gastrointestinaltrakt erklären. Durch diesen enterohepatischen Kreislauf des Biopterins wird der Ausscheidungsweg überwiegend renal.

4.4.7. Bilanzierung von Biopterin - eine zelluläre Leistung

Im Lichte dieser Befunde sind Biopterin und möglicherweise

auch 7,8-Dihydrobiopterin als Stoffwechselendprodukte anzusehen. Die Regulation der endogenen Biosynthese des aktiven Kofaktors gewinnt damit eine wichtige Funktion in der kontrollierten zellulären Versorgung und seinen Konsequenzen für die Katecholamin- und Serotoninbiosynthese. Vergleicht man die vorliegenden biochemischen und physiologischen Befunde dieser Arbeit, so erscheint die Bilanzierung des Tetrahydrobiopterins in erster Linie eine zelluläre Leistung darzustellen. Dabei gibt es zwischen den einzelnen Zelltypen der Organparenchyme funktionelle Unterschiede in der Biosyntheseleistung. Erhöhte Gewebespiegel crithidiaaktiver Substanzen und erhöhte Syntheseleistungen (81) findet man in Organen mit anaboler und kataboler Aktivität wie der Leber und der Niere, den Katecholamin und Indolalkylamin synthetisierenden Organen. Die Befunde von Kokolis (27) deuten außerdem darauf hin, daß die Syntheseleistung unter bestimmten Stoffwechselzuständen erhöht ist und damit einer Regulation unterliegt. Für das Gehirn gilt wegen der Blut-Hirnschranke in jedem Falle, daß der aktive Kofaktor endogen dem Bedarf entsprechend synthetisiert werden muß. Störungen bei der Kontrolle der Tetrahydrobiopterinbiosynthese oder -regenerierung können dann zu schweren Erkrankungen wie im beschriebenen Fall führen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mögliche Angriffspunkte bei der Regulation des Biopterinbestandes im Säuger mit biochemischen, histologischen und physiologischen Methoden zu erfassen. Die Suche nach Transportproteinen für reduzierte Pterine im Humanserum erforderte die Synthese ^3H -markierter Pteridine mit hoher spezifischer Radioaktivität. Die Pteridine DMP (XI), DMPH_4 (XVIII) und DADMPt (XII) wurden durch Kondensation der geeigneten Pyrimidine mit ^3H -Diacetyl und durch katalytischen Brom-Tritiumaustausch aus den entsprechenden Brommethylpteridinen hergestellt. Die Pterine XI und XVIII wurden mit einer spezifischen Radioaktivität von 3,3 und das Pteridin XII von 5,3 Ci/mmol synthetisiert.

Von Human- und Rattenblut werden alle betrachteten Pteridine (2^{14}C -Biopterin, 2^{14}C - BH_4 , ^3H -DMP, ^3H - DMPH_4 und ^3H -DADMPt) hauptsächlich unspezifisch gebunden. Die Bindungskapazität der Humanserumproteine geht bis zur Löslichkeitsgrenze der Pteridine ohne Absättigung der Bindungsstellen. Im Konzentrationsbereich von 10^{-10} - 10^{-8} M zeigt der biphasige Verlauf der Bindungskurve das Vorkommen Tetrahydropterin bindender Proteine, die bei einer Konzentration von 8 nM abgesättigt sind und deren Bindungskapazität 0,3 nmol Pterin/g Protein beträgt. Discelektrophoretisch wurden diese Proteine als α_2 -Makroglobuline identifiziert. Adsorptive Bindung an Proteine schützt die Tetrahydropterine vor Autoxidation. Erythrocyten tauschen ihren Biopterin Gehalt mit dem Plasma zu langsam aus, um Bedeutung für den Kofaktortransport zu haben. Mikrobiologische Bestimmungen zeigen, daß Biopterin intrazellulär angereichert ist. Die Leber enthält von allen betrachteten Organen den höchsten Kofaktorspiegel (4,6 $\mu\text{mol/kg}$). Biopterin ist entsprechend seiner Rolle im System der misch-

funktionellen Oxygenasen funktionell kompartimentiert. Hirn-areale, in denen überwiegend Katecholamine und Serotonin als Neurotransmitter wirken, enthalten Biopterin in höherer Konzentration (Hypothalamus $0,49 \mu\text{mol/kg}$) als die Großhirnrinde ($0,07 \mu\text{mol/kg}$).

Die Radioaktivität von 2^{14}C -Tetrahydrobiopterin wird nach i. v. Injektion vor allem in die Leber und gegen einen Konzentrationsgradienten eingebaut. Die Niere inkorporiert ebenfalls Radioaktivität. Der injizierte Kofaktor wird aus dem Blut entfernt, aber nicht in Erythrocyten eingebaut. Er kann die Blut-Hirnschranke nicht überwinden. Dieser Befund wird durch die Messung der Biopterinspiegel im CSF am Menschen vor und nach Injektion von BH_4 (2 mg/kg) gestützt.

Die i. v. Injektion von BH_4 im Falle eines Patienten mit einem gestörten Biopterinstoffwechsel führt zu einer dosisabhängigen Abnahme der Phenylalaninspiegel und zu einem Anstieg der Katecholaminmetabolite im Harn und CSF. Der verbrauchte Kofaktor wird renal eliminiert. Das Pteridinmuster im Harn dieses Patienten ist von dem einer gesunden Kontrollperson verschieden. Subzellulär ist Biopterin ein Bestandteil des Cytosols. Eine Abschätzung der Konzentrationen ergab für das Cytosol $1,5 \mu\text{mol/l}$ und für die Mitochondrien $0,25 \mu\text{mol/l}$. Physiologische Experimente zeigen, daß der frei filtrierte Kofaktor BH_4 , das Biopterin und die strukturanalogen Pterine XI und XVIII praktisch nicht im Nephron resorbiert werden. Das Diureticum DADMPt (XII) dagegen wird auf Grund seiner größeren Lipidlöslichkeit und zell-toxischer Effekte resorbiert. Clearancestudien ergaben, daß die Niere Biopterin (Crithidiaaktivität) in das Nephron und in die Blutbahn sezerniert. Dieser Befund deutet auf eine hohe Biosyntheseleistung der Niere und auf eine wichtige Funktion in der Bilanzierung des Kofaktors hin.

6. LITERATUR

1. F.G. Hopkins
Nature (London) 40, 335 (1889)
2. R. Purrmann
Ann. 544, 182 - 190 (1940)
3. E.L. Patterson, R. Milstrey, E.L.R. Stokstad
J. Am. Chem. Soc. 78, 5868 - 5871 (1956)
4. H. Rembold, W.L. Gyure
Angew. Chem. 84, 1088 - 1099 (1972),
Int. Ed. 11, 1061 - 1072 (1972)
5. M. Viscontini, M. Schoeller, E. Loeser, P. Karrer,
E. Hadorn
Helv. Chim. Acta 38, 397 - 401 (1955)
6. H.S. Forrest, H.K. Mitchell
J. Am. Chem. Soc. 77, 4865 - 4869 (1955)
7. M. Viscontini, A. Kühn, A. Egelhaaf
Z. Naturf. 11 b, 501 - 504 (1956)
8. F.M. Premdas, J.G. Eales
Comp. Biochem. Physiol. 53, 561 - 567 (1976)
9. G.H. Schmidt, M. Viscontini
Helv. Chim. Acta 45, 1571 - 1575 (1962)
10. H. Rembold, L. Buschmann
Ann. 662, 72 - 82 (1963)
11. H. Rembold "Untersuchungen über den Stoffwechsel des
Biopterins und über die polarographische Charakterisie-
rung von Pteridinen" in "Pteridine Chemistry",
W. Pfeleiderer, E. C. Taylor, Eds., Pergamon Press,
Oxford (1964) pp. 465 - 484
12. A. Butenandt, H. Rembold
Z. physiol. Chem. 311, 79 - 83 (1958)
13. S. Kaufman
J. Biol. Chem. 234, 2677 - 2682 (1959)
14. S. Kaufman
Proc. Natl. Acad. Sci. US 50, 1085 - 1093 (1963)
15. A.R. Brenneman, S. Kaufman
Biochem. Biophys. Res. Comm. 17, 177 - 183 (1964)
16. S. Nakamura, A. Ichiyama, O. Hayaishi
Fed. Proc. 24, 604 (1965)

17. A. Tietz, M. Lindberg, E. P. Kennedy
J. Biol. Chem. 239, 4081 - 4090 (1964)
18. D. D. Hagerman
Fed. Proc. 23, 480 (1964)
19. M. Nishikimi
Biochem. Biophys. Res. Comm. 63, 92 - 98 (1975)
20. M. Levitt, S. Spector, A. Sjoerdsma, S. Udenfriend
J. Pharm. Exp. Ther. 148, 1 - 8 (1965)
21. G. Curzon "Transmitter Amines in Brain Disease" in
"Biochemistry and Neurological Disease"
A. N. Davison Ed., Blackwell Scient. Publ., Oxford
(1976) pp. 168 - 227
22. H. Rembold, H. Metzger
Z. physiol. Chem. 348, 194 - 198 (1967)
23. M. C. Archer, K. G. Scrimgeour
Can. J. Biochem. 48, 526 - 527 (1970)
24. G. Hanser, H. Rembold
Z. Naturf. 23 b, 666 - 670 (1968)
25. H. Rembold, K. Buff
Eur. J. Biochem. 28, 579 - 585 (1972)
26. H. Rembold, K. Buff
Eur. J. Biochem. 28, 586 - 591 (1972)
27. N. Kokolis
Int. J. Biochem. 6, 475 - 478 (1975)
28. H. Herken "Pseudoaldosteronantagonisten" in Hand-
buch der exp. Pharmakol.
H. Herken Ed. Springer, Berlin (1969) Bd. XXIV,
pp. 494 - 549
29. J. R. Bertino
Canc. Res. 23, 1286 - 1306 (1963)
30. R. T. Kuczenski, A. J. Mandell
J. Biol. Chem. 247, 3114 - 3122 (1972)
31. I. Katz, T. Lloyd, S. Kaufman
Biochim. Biophys. Acta 445, 567 - 578 (1976)
32. M. Ikeda, M. Levitt, S. Udenfriend
Arch. Biochem. Biophys. 120, 420 (1967)
33. T. Lloyd, N. Weiner
Mol. Pharmakol. 7, 569 - 580 (1971)
34. T. Nagatsu, T. Yamamoto, I. Nagatsu
Biochim. Biophys. Acta 198, 210 (1970)

35. D.G. Grahame-Smith
Biochem. J. 105, 351 - 360 (1967)
36. P.A. Friedman, A.H. Kappelman, S. Kaufman
J. Biol. Chem. 247, 4165 - 4173 (1972)
37. M. Karobath, R.J. Baldessarini
Nature New Biol. 236, 206 - 208 (1972)
38. S. Kaufman, N.A. Holtzman, S. Milstien, I.J. Butler,
A. Krumholz
New Engl. J. Med. 293, 785 - 790 (1975)
39. J. Smith, B.E. Clayton, O.H. Wolff
Lancet i, 1108 - 1111 (1975)
40. K. Bartolomé
Lancet ii, 1580 (1974)
41. D.M. Danks, R.G.H. Cotton, P. Schlesinger
Lancet i, 1236 - 1237 (1976)
42. G.A. Jervis
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 82, 514 - 515 (1953)
43. K. Bartholomé (1976), persönliche Mitteilung
44. R.J. Leeming, J.A. Blair, F. Rey
Lancet i, 99 - 100 (1976)
45. K. Bartholomé, P. Lutz, H. Bickel
Pediat. Res. 9, 899 - 903 (1975)
46. H. Rembold, V. Chandrashekar, P. Sudershan
Biochim. Biophys. Acta 237, 365 - 368 (1971)
47. H. Rembold, K. Buff, G. Hennings
Clin. Chim. Acta im Druck (1977)
48. B. Green, H. Rembold
Chem. Ber. 99, 2162 - 2171 (1966)
49. R. Fittig, C. Daimler, H. Keller
Ann. 249, 207 (1888)
50. W. Franke, W. Ziegenbein, H. Meister
Angew. Chem. 72, 391 - 426 (1960)
51. C.K. Cain, M.F. Mallette, E.C. Taylor
J. Am. Chem. Soc. 68, 1996 - 1999 (1946)
52. J.H. Boothe, J.M. Mowat, G.W. Waller, R.B. Angier,
J. Semb, A.L. Gazzola
J. Am. Chem. Soc. 74, 5407 - 5409 (1952)
53. H. Rembold, L. Buschmann
Z. physiol. Chem. 330, 132 - 139 (1962)

54. F. Wroblewski, J. S. Ladue
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 90, 210 - 215 (1955)
55. Y. Ohmori
Enzymologia 4, 217 - 231 (1937)
56. M. Osanai, H. Rembold
Biochim. Biophys. Acta 162, 22 - 31 (1968)
57. S. J. Cooperstein, A. Lazarow
J. Biol. Chem. 189, 665 - 672 (1951)
58. H. v. Belle
Anal. Biochem. 33, 132 - 142 (1970)
59. E. J. King
Biochem. J. 26, 292 - 297 (1932)
60. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr,
R. J. Randall
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)
61. G. A. Puca, E. Nola, V. Sica, F. Bresciani
Adv. Biosci. 7, 97 - 113 (1970)
62. L. Ornstein
Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 321 - 348 (1962)
63. P. Cuatrecasas, I. Parikh
Biochem. 11, 2291 - 2299 (1972)
64. P. Cuatrecasas, I. Parikh
J. Biol. Chem. 245, 3059 - 3065 (1970)
65. J. Glowinski, L. L. Iversen
J. Neurochem. 13, 655 - 669 (1966)
66. J. F. Koennig, R. A. Klippel
"The Rat Brain" Williams and Wilkins, Baltimore
(1963)
67. C. de Duve, B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux,
F. Appelmans
Biochem. J. 60, 604 - 617 (1955)
68. E. G. Gray, V. P. Whittaker
J. Anat. 96, 79 - 87 (1962)
69. H. N. Guttman
Exp. Parasit. 129, 255 - 266 (1963)
70. G. W. Kidder, B. N. Dutta
J. gen. Microbiol. 18, 621 - 638 (1958)
71. H. U. Bergmeyer
Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim (1974), Bd. I pp. 33 - 335

72. H. Baker, O. Frank, C.J. Bacchi, S.H. Hutner
Am. J. Clin. N. 27, 1247 - 1253 (1974)
73. A.F. Fleming, H.P. Broquist
Am. J. Clin. N. 20, 613 - 621 (1967)
74. R.J. Leeming, J.A. Blair, V. Melikian, D.J. O'Gorman
J. Clin. Path. 29, 444 - 451 (1976)
75. G. Bartholini, K.G. Lloyd, A. Pletscher
Life Sci. 14, 323 - 328 (1974)
76. J.M. Saavedra, M. Palkovits, M. Brownstein,
J. Axelrod
Brain. Res. 77, 157 - 165 (1974)
77. J. Killander
Biochim. Biophys. Acta 93, 1 - 14 (1964)
78. S. Katoh, Y. Arai, T. Taketani, S. Yamada
Biochim. Biophys. Acta 370, 378 - 388 (1974)
79. D.A. Häberle, G. Ruhland, G. Hennings, H. Rembold
Pflüg. Arch. ges. Physiol. 362, R11:42 (1976)
80. M.E. O'Flynn, P. Tillman, D.Y.Y. Hsia
Am J. Dis. Child. 113, 22 - 30 (1967)
81. I. Eto, K. Fukushima, T. Shiota
J. Biol. Chem. 251, 6505 - 6512 (1976)
82. D.M. Danks, R.G.H. Cotton, P. Schlesinger,
H. Rembold, G. Hennings (1977) in Vorbereitung
83. B.M. Watson, P. Schlesinger, R.G.H. Cotton
(1977) zur Veröffentlichung eingereicht
84. H. Rembold, H. Metzger, P. Sudershan,
W. Gutensohn
Biochim. Biophys. Acta 184, 386 - 396 (1969)
85. H. Rembold, H. Metzger, W. Gutensohn
Biochim. Biophys. Acta 230, 117 - 126 (1971)
86. H. Rembold "Catabolism of Unconjugated Pteridines"
in "Chemistry and Biology of Pteridines"
Proc. IVth Int. Symp. on Pteridines, Toba, 1969,
pp. 163 - 178
87. R.D. Myers "The Role of Hypothalamic Serotonin in
Thermoregulation" in "Serotonin and Behavior"
J. Barchas, E. Usdin, Eds. Acad. Press, New York
(1973) pp. 293 - 302
88. D.S. Herr, M.S. Matheson, W.D. Walters
J. Am. Chem. Soc. 63, 1464 - 1467 (1941)

89. R.L. Beach, G.W.E. Plaut
Biochemistry 9, 760 - 770 (1970)
90. G.W.E. Plaut, R.L. Beach, T. Aogaichi
Biochemistry 9, 771 - 785 (1970)
91. A. Coppen "Role of Serotonin in Affective Disorders"
in "Serotonin and Behavior" J. Barchas, E. Usdin Eds.
Acad. Press, New York (1973) pp. 523 - 527
92. K. Krnjevic
Physiol. Rev. 54, 419 - 540 (1974)
93. T. Nagatsu, M. Levitt, S. Udenfriend
J. Biol. Chem. 239, 2910 - 2917 (1964)
94. E.G. McGeer, P.L. McGeer
in "New Concepts in Neurotransmitter Regulation"
A. J. Mandell Ed., Plenum Press, New York (1973),
pp. 53 - 58
95. H. Weil-Malherbe, J. Axelrod
J. Neurochem. 8, 55 - 64 (1961)
96. R. Kettler, G. Bartholini, A. Pletscher
Nature 249, 476 - 478 (1974)
97. H. Bernheimer, W. Birkmayer, O. Hornykiewicz,
K. Jellinger, F. Seitelberger
J. Neurol. Sci. 20, 415 - 455 (1973)
98. W. Birkmayer, W. Danielczyk, E. Neumayer,
P. Riederer
J. Neur. Transm. 33, 163 - 178 (1972)
99. K. J. Stone
Biochem. J. 157, 105 - 109 (1976)
100. N.O. Kaplan, M. M. Ciotti
J. Biol. Chem. 221, 823 (1956)
101. H. Herken
Arzneim. Forsch. 18, 1235 - 1245 (1968)
102. A. Yoshida, T. Yamada, S. Koshikawa
Biochem. Pharmacol. 20, 1933 - 1942 (1971)
103. V.D. Wiebelhaus, J. Weinstock, A.R. Maass,
F.T. Brennan, G. Sosnowski, T. Larsen
J. Pharmacol. Exp. Ther. 149, 397 - 403 (1965)
104. W.J. Baba, G.R. Tudhope, G.M. Wilson
Clin. Sci. 27, 181 - 193 (1964)
105. J. T. Coyle
Biochem. Pharmacol. 21, 1935 - 1944 (1972)

106. S. Algeri, M. Bonati, F. Ponzio, A.J. Turner
Brit.J.Pharmacol. 52, 448 (1974)
107. M. Brownstein, J.M. Saavedra, M. Palkovits
Brain Res. 79, 431 - 436 (1974)
108. S. Waxman
"The Role of Folate Binding Proteins in Folate Metabolism" in "Chemistry and Biology of Pteridines",
W. Pfeleiderer Ed. Proc. Vth Int. Symp. on Pteridines,
Konstanz 1975
W. de Gruyter Berlin (1975) pp. 165 - 178
109. J.A. Blair, K. Ratenasthien, R.J. Leeming
Gut 15, 832 (1974)
110. H. Rembold, H. Metzger
Z. Naturf. 22 b, 827 - 830 (1967)
111. H. Rembold, H. Metzger
Chem. Ber. 96, 1395 - 1405 (1963)
112. P. Schlesinger, R.G.H. Cotton, D.M. Danks
Lancet ii, 1245 (1976)
113. H. Kraut, W. Pabst, H. Rembold, L. Wildemann
Z. physiol. Chem. 332, 101 - 108 (1963)
114. W. Pabst, H. Rembold
Z. physiol. Chem. 344, 107 - 112 (1966)
115. S. Kaufman, D.B. Fisher "Pteridin Requiring Aromatic
Amino Acid Hydroxylases" in "Molecular Mechanismus
of Oxygen Activation", O. Hayaishi, Ed., Acad. Press,
New York (1974), pp. 285 - 369
116. S. Kaufman
Adv. Enzymol. 35, 245 - 319 (1971)
117. W. Burkhard, K. Gey, A. Pletscher
Med. Pharmacol. Exp. 13, 388 (1965)

7. LEBENSLAUF

Am 2. Juli 1948 wurde ich als Sohn des Maschinenschlossers Heinrich Hennings und seiner Ehefrau Gisela in Uelzen, Niedersachsen, geboren.

Von 1959 bis 1967 besuchte ich das mathematisch-naturwissenschaftliche und neusprachliche Gymnasium der Christianschule in Hermannsburg, Kreis Celle. Hier legte ich auch im Juni 1967 die Reifeprüfung ab.

Nach Ableistung des Wehrdienstes vom Juli 1967 bis Dezember 1968 nahm ich im Sommersemester 1969 das Studium der Chemie an der Universität München auf. Nachdem ich die Diplomchemiker-Hauptprüfung im Juni 1973 erfolgreich abgelegt hatte, begann ich im Juli 1973 mit der Diplom- und Doktorarbeit auf dem Gebiet der Biochemie der Pteridine bei Herrn Prof. Dr. H. Rembold am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried. Diese Arbeiten wurden im Januar 1977 abgeschlossen.

8. ANHANG

Zuchtmedien für *Crithidia fasciculata* (ATCC 12857)

8.1. Lösungen und Zusätze

8.1.1. Die Häminlösung bestand aus 500 mg Hämin in einer Mischung von 50 ml destilliertem Wasser und 40 ml Triäthanolamin.

8.1.2. Vitaminlösung

100 ml Vitaminlösung enthielten 80 mg Nicotinamid, 320 mg Calciumpantothenat, 80 mg Riboflavin, 16 mg Thiamin, 80 mg Pyridoxin und 0,1 mg Biotin.

8.1.3. Trockensubstanz

Die Trockensubstanz (Dry Mix) bestand aus 100,0 g Caseinhydrolysat HyCase S. F. (O. Aldag, Hamburg), 20,0 g Kaliumcitrat, 10,0 g MgCO_3 , 120,0 g Saccharose, 6,0 g Natriumacetat, 3,0 g Äthylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA), 2,0 g L-Glutaminsäure, 0,8 g L-Tryptophan, 0,5 g Adenosinmonophosphat (AMP), 0,25 g Thymin, 0,2 g Thymidin, 0,2 g CaCO_3 und 1,3 g "Salze".

8.1.4. Salze

Die Mischung bestand aus 2,5 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 1,0 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,05 g $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und 0,01 g Borsäure.

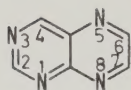
8.2. Erhaltungsmedium

1 Liter Erhaltungsmedium (pH 7,8) enthält 5 g Hefeextrakt (Difco), 5 g Pepton aus Casein, 10 g Saccharose, 25 mg Leberextrakt (Difco) und 5 ml Häminlösung.

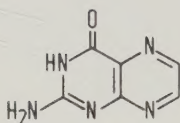
8.3. Basalmedium (biopterinfrei)

Zu 400 ml destilliertem Wasser wurden 16,5 g Trockensubstanz, 31,3 mg K_3PO_4 und 1,7 ml Milchsäure (90 %) gegeben. Diese Suspension wurde unter Rühren erhitzt, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Nach Abkühlung wurde mit 1 N NaOH leicht alkalisch gemacht (pH 8,0 - 9,0), 2,5 ml Häminlösung zugegeben und mit 1 N HCl auf pH 7,8 eingestellt. Schließlich wurden 5 ml Vitaminlösung zugefügt und auf 500 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

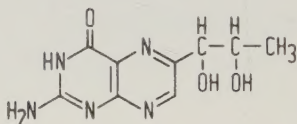
I



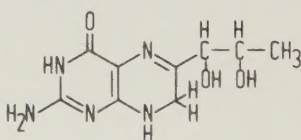
II



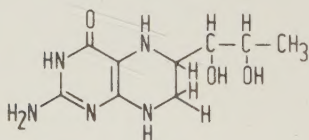
III



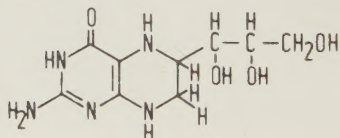
IV



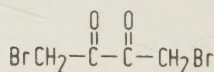
V



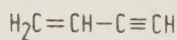
VI



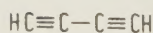
VII



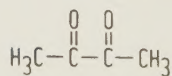
VIII



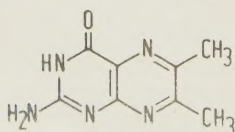
IX



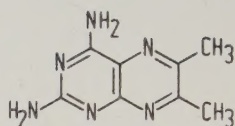
X



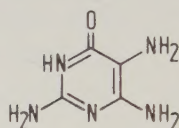
XI



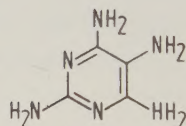
XII



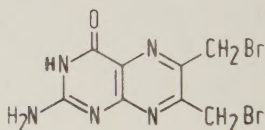
XIII



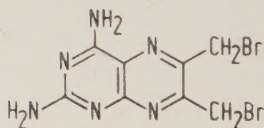
XIV



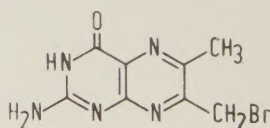
XV



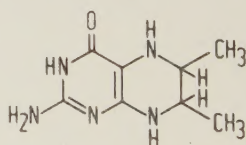
XVI



XVII



XVIII



XIX

